提 要

**目的：**本研究旨在探讨电针心俞、厥阴俞穴对大鼠心肌缺血再灌注损伤（MIRI） 心功能的保护作用及其对心肌细胞凋亡与相关因子的影响，为研究针刺对心肌缺血再灌注损伤可能的保护机制提供有益数据。

**方法：**通过结扎左冠状动脉前降支的方法建立大鼠 MIRI 模型，80 只大鼠随机分为 10 组(每组 8 只)：(1)假手术Ⅰ组、Ⅱ组；（2）模型Ⅰ组、Ⅱ组；（3）治疗Ⅰ组、

Ⅱ组；（4）阳性对照Ⅰ组、Ⅱ组；（5）阴性对照Ⅰ组、Ⅱ组。其中各组的Ⅰ组电针治疗 3 天，Ⅱ组电针治疗 7 天。

采用 ELISA、TUNEL 法及免疫组化等方法，分别测定各组血清 TNF-a、ICAM-1 含量，细胞凋亡指数及 Fas、FasL、HtrA2、P38MAPK、5-LOX 和 CYP450 蛋白阳性水平指数。

**结果：**1、与假手术组相比,模型组 TNF-α、ICAM-1 含量、细胞凋亡指数、Fas、

FasL、HtrA2、CYP450 蛋白表达高于假手术组（P<0.05），P38MAPK 蛋白表达则低于假手术组（P<0.05）。

2、与模型组相比，治疗组治疗 3 天后细胞凋亡指数、Fas、FasL、HtrA2、5-LOX、

CYP450 蛋白表达低于模型组（P<0.05），P38MAPK 蛋白表达则高于模型组（P<0.05）， TNF-α、ICAM-1 含量与模型组无统计学差异。

3、与模型组相比，治疗组治疗 7 天后 TNF-α、ICAM-1 含量、细胞凋亡指数、Fas、FasL、HtrA2、5-LOX、CYP450 蛋白表达低于模型组（P<0.05），P38MAPK 蛋白表达则高于模型组（P<0.05）。

4、治疗 3 天组与治疗 7 天组相比，其血清 TNF-α及 ICAM-1 含量、Fas、HtrA2 和 CYP450 的蛋白表达均低于后者，其心肌细胞凋亡指数（AI）、FasL、P38MAPK、5-LOX蛋白表达则高于后者。

**结论：**电针心俞穴、厥阴俞穴对缺血再灌注损伤心肌有明显的保护作用。其机制可能与降低缺血再灌注损伤大鼠血清中 TNF-α、ICAM-1 含量，促进心肌细胞中

P38MAPK 的表达，降低 Fas 和 FasL、HtrA2、5-LOX 及 CYP450 的表达以及抑制细胞凋亡密切相关。电针心俞、厥阴俞穴治疗心肌缺血再灌注损伤 7 天疗程疗效优于 3 天疗程。

关键词 心俞穴、厥阴俞穴；心肌缺血再灌注损伤；细胞凋亡

**The Study of Electro-Acupuncture Xinshu and Jueyinshu on Myocardial Apoptosis Related Factors in Ischemia Reperfusion Injury**

**Specialtity:** Acupuncture and Moxibustion

**Author:** Zhang Xin

**Tutor:** Tan Qiwen

**Abstract**

**Objective:** The aims of this study are to assess the protective effect of electro-acupuncture" Xinshu" and" Jueyinshu" on myocardial ischemia reperfusion injury in rats, and to explore mechanism of anti-apoptosis related factors for acupuncture

“Xinshu" and" Jueyinshu" on myocardial ischemia reperfusion injury.

**Methods:** All the wistar rats were randomly divided into 10 groups(n=8 in each group): (1) Sham-operation groupⅠ、Ⅱ, (2) Model groupⅠ、Ⅱ, (3) Treatment groupⅠ、Ⅱ, (4) Positive control groupⅠ、Ⅱ, (5) Negative control groupⅠ、Ⅱ. SeriesⅠwere treated for 3 days and seriesⅡwere treated for 7 days with electro-acupuncture.

A comparative study on the apoptosis index(AI), were conducted The expression characteristics of target gene Fas/FasL, high temperature requirement A2(HtrA2), 5-lipoxygenase(5-LOX) and Cytochrome P450 monooxygenase(CYP450) in myocardial

Tissue were achieved. The apoptosis related factors and acupuncture relevance were analyzed. The plasma cytokines TNF-αand ICAM-1 were also measured by ELISA.

**Results:** 1. Compared with Sham-operation group, the expression of

Pro-inflammatory factors TNF-αand ICAM-1, the apoptosis index(AI), and the apoptosis related factors i. e. Fas, FasL, HtrA2, CYP450 were significantly upregulated in Model group.

2. Compared with Model group, the apoptosis index, and the apoptosis related factors

I. e. Fas, FasL, HtrA2, CYP450 were significantly downregulated, whereas P38 mitogen-activated protein kinase P38 (P38MAPK) was increased in Treatment groupⅠ(treated 3 days). There were no significance on plasma profiles of TNF-α and

ICAM-1.

3. Compared with Model group, the plasma profiles of TNF-αand ICAM-1, AI, and the apoptosis related factors Fas, FasL, HtrA2, CYP450 were significantly downregulated, whereas P38 mitogen-activated protein kinase P38(P38MAPK) was increased in Treatment groupⅡ(treated 7days).

4. In the Treatment group, our findings indicated that the level of plasma cytokines TNF-αand ICAM-1, and the apoptosis related factors Fas, HtrA2, CYP450 in GroupsⅠ, which were treated 3 days, were lower than that of GroupsⅡ. On the other hand, the AI and the expression of FasL, P38MAPK, 5-LOX in GroupsⅠwere higher than that of GroupsⅡ, which were treated 7 days.

**Conclusion:** In conclusion, these results clearly indicated electro-acupuncture" Xinshu" and" Jueyinshu" protects myocardial tissue in MIRI, due to altered expression levels of the apoptosis related factors and inflammatory factors; meanwhile increasing the expression of P38MAPK. Our results also raise the possibility that the Treatment 7 days Group has better protective effect than Treatment 3 days Group at the early stage of the MIRI.

**Keywords:** Xinshu; Jueyinshu; Myocardial ischemia and reperfusion injury; Cardiomyocytes apoptosis

目 录

**[Abstract](#_Toc686949149)** 2

[引 言](#_Toc686949150) 3

[1 材料和方法](#_Toc686949151) 5

[1.1 材料](#_Toc686949152) 5

[1.2 方法](#_Toc686949153) 5

[2 观察指标及检测方法](#_Toc686949154) 6

[2.1 观察指标](#_Toc686949155) 6

[2.2 检测方法](#_Toc686949156) 6

[3 统计学方法](#_Toc686949157) 6

[4 实验结果与分析](#_Toc686949158) 6

[4.1 Ⅰ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量比较](#_Toc686949159) 6

[4.2 Ⅱ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量比较](#_Toc686949160) 7

[4.3 Ⅰ组与Ⅱ组TNF-α含量的比较](#_Toc686949161) 8

[4.4 Ⅰ组与Ⅱ组ICAM-1含量的比较](#_Toc686949162) 9

[实验二电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响](#_Toc686949163) 10

[1 材料和方法](#_Toc686949164) 10

[1.1 材料](#_Toc686949165) 10

[1.2 方法](#_Toc686949166) 10

[2 观察指标及检测方法](#_Toc686949167) 11

[2.1 观察指标](#_Toc686949168) 11

[2.2 检测方法](#_Toc686949169) 11

[3 统计学方法](#_Toc686949170) 11

[4 实验结果与分析](#_Toc686949171) 11

[4.1 Ⅰ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）](#_Toc686949172) 11

[4.2 Ⅱ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）](#_Toc686949173) 12

[4.3 Ⅰ组与Ⅱ组相大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）的比较](#_Toc686949174) 12

[4.4 大鼠心肌细胞凋亡病理表现](#_Toc686949175) 12

[实验三电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡调控因素的影响](#_Toc686949176) 13

[1 材料和方法](#_Toc686949177) 13

[1.1 材料](#_Toc686949178) 13

[1.2 方法](#_Toc686949179) 14

[2 观察指标及检测方法](#_Toc686949180) 14

[2.1 观察指标](#_Toc686949181) 14

[2.2 检测方法](#_Toc686949182) 14

[3 统计学方法](#_Toc686949183) 15

[4 实验结果与分析](#_Toc686949184) 15

[4.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK的影响](#_Toc686949185) 18

[4.3 电针心俞、厥阴俞对肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2的影响](#_Toc686949186) 20

[实验四电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠5-LOX和CYP450的影响](#_Toc686949187) 21

[1 材料和方法](#_Toc686949188) 21

[1.1 材料](#_Toc686949189) 21

[1.2 方法](#_Toc686949190) 21

[2 观察指标及检测方法](#_Toc686949191) 22

[2.1 观察指标](#_Toc686949192) 22

[2.2 检测方法](#_Toc686949193) 22

[3 统计学方法](#_Toc686949194) 22

[4 实验结果与分析](#_Toc686949195) 22

[4.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX的影响](#_Toc686949196) 22

[4.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450的影响](#_Toc686949197) 23

[讨论](#_Toc686949198) 24

[1 选穴依据](#_Toc686949199) 24

[2 现代医学对背俞穴作用机制的探讨](#_Toc686949200) 24

[3 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠血清抗炎因子TNF-a、ICAM-1的影响](#_Toc686949201) 24

[4 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响](#_Toc686949202) 25

[3 天（6.046±1.348），亦呈现出心肌细胞持续凋亡的趋势，但各自都低于模型组，显然电针背俞可以抑制心肌细胞的凋亡，而且这种治疗持续有效，提示我们临床治疗时应长期针刺，而不能仅仅针刺1天就结束治疗。](#_Toc686949203) 25

[5 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡调控因素的影响](#_Toc686949204) 25

[5.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas、FasL的影响](#_Toc686949205) 25

[5.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK的影响](#_Toc686949206) 25

[5.3 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2的影响](#_Toc686949207) 25

[6 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠5-LOX和CYP450的影响](#_Toc686949208) 26

[6.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX的影响](#_Toc686949209) 26

[6.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450的影响](#_Toc686949210) 26

[结语](#_Toc686949211) 26

[参考文献](#_Toc686949212) 26

[综述](#_Toc686949213) 27

[参考文献](#_Toc686949214) 29

[附录](#_Toc686949215) 30

引 言

缺血性心脏病是严重影响人类健康的常见病之一，世界卫生组织资料表明，全球冠心病患者已达1.6亿，其发病率和病死率在逐年增加[1]。大量报道显示，心脏缺血再灌注后，会造成心肌组织损伤加重，甚至发生不可逆性损伤的现象[2]，被称为心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemiareperfusion injury, MIRI）。如何避免或减轻MIRI，成为急性缺心肌血治疗中的一项重要课题。临床实践证明，针灸疗法可有效缓解MIRI。本研究旨在通过动物实验，观察针刺对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的心脏损伤和心肌细胞凋亡的影响，探讨针刺治疗心肌缺血再灌注损伤的机理，为临床用穴提供大有裨益的思路和方法。

研究显示，导致MIRI的机理颇为复杂，它的发生与活性氧大量产生、细胞内钙超载、中性粒细胞活化和高能磷酸化合物生成障碍等有关，细胞凋亡可能是其发生机制的重要环节之一[3-5]。细胞凋亡的多少决定心肌缺血再灌注损伤的轻重，心肌梗死灶周边区域的心肌细胞凋亡扩大了梗死面积，促进了心室重构，对心肌产生不利影响

[6]. 与细胞死亡不同，凋亡是由多种相关基因调控的一种可逆性的细胞主动性死亡的

过程。针对细胞凋亡发生的原因及规律，在缺血再灌注过程中，通过促进抑凋亡基因的表达，阻断凋亡信息传导通路等，从而减轻细胞凋亡的发生。

在针对细胞凋亡发生的原因及规律治疗MIRI的研究中，无论运用西药、中医药还是手术操作，大多是先进行缺血预处理，从而减轻由再灌注引起的细胞凋亡，起到对心肌的保护作用。但临床应用很难做到在病人缺血前进行某种预处理，而在病人出现心肌缺血再灌注损伤后，进行及时有效治疗，更具临床意义。目前针对心肌缺血再灌注损伤后处理的研究，大多于集中在缺血再灌注数分钟至数小时，而研究表明心肌缺血再灌注后的细胞凋亡，可能会持续数天[7]，故需要将此研究的时间延长，探讨较长时间的后处理对心肌缺血再灌注损伤的影响。

心肌缺血属于中医学的“心痛、胸痹、真心痛等”范畴，其病机为气滞血瘀，针刺治疗此病疗效确切。背俞穴作为脏腑气血输注于背腰部的一类特定穴，自古以来是针灸治疗脏腑疾病的首选之一，心俞和厥阴俞为心的气血输注所在，是临床治疗本病的常用穴[8]。

肿瘤坏死因子-α（Tumor Necrosis Factor, TNF-α）和细胞间黏附分子



ELISA 法 测

定 血 清 中TNF-α

ICAM-1 含量

TUNEL 法进

行心肌细胞凋亡指数检测

用免疫组化法测定心肌Fas、FasL、P38、5-LOX 、 Htra2 、

cyp450 蛋白水平

-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)炎症因子的含量与心肌缺血再灌注损伤密切相关。5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、线粒体丝氨酸蛋白酶(high temperature requirementA2, HtrA2)、细胞色素P450单氧化酶（cytochrome P450

monooxygenase）、Fas与FasL及P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)等经研究证实参与了细胞凋亡的调控，其蛋白的表达，决定了心肌缺血再灌注损伤的程度[9]。

本研究用结扎冠脉再灌的方法造模，将心肌缺血再灌注损伤的大鼠随机分为假手术组、模型组、治疗组、阳性对照组、阴性对照组，分别检测术后4天（针刺3天）

和术后8天（针刺7天）各指标的情况，经统计学分析，探讨电针心俞、厥阴俞对

MIRI大鼠心肌保护作用的影响，并评价不同治疗时间的疗效差异。



Wistar 大鼠 80 只随机分为 10 组，每组 8 只

治疗组Ⅰ

阳性对照组Ⅰ

阴性对照组Ⅰ

模型组Ⅰ

假手术组Ⅰ

假手术组Ⅱ

技术路线：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 治疗组Ⅱ | |  | 阳性对照组Ⅱ | |  | 阴性对照组Ⅱ | |  | 模型组Ⅱ | |
|  |  | | |  | | |  | | |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 结扎冠脉左前降支再灌注 | |  | 假手术 | |
|  |  | | |  |





术后第 2 天开始针刺

阴性对照组

治疗组

阳性对照组



模 型 组

假 手 术组

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Ⅰ组术后 4 天取材观测指标 | |  | Ⅱ组术后 8 天取材观测指标 | |
|  |  | | |  |

实验一 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠血清炎症因子TNF-a、ICAM-1的影响

对于急性心肌缺血的治疗，首要是恢复血液灌注，解除组织的缺氧和营养物质供应不足的状态，以阻止缺血性损伤的发展或促使其恢复，且大量临床证明，这种治疗在大多数情况下都获得了较好的效果。因此，解痉、溶栓、手术取栓、血管成形术等已成为传统的治疗方法而广泛应用，并不断发展。近年来随着研究的深入，人们发现心肌缺血后再灌注可以导致进一步的损伤，如心率失常，梗死面积扩大，持久性心室收缩功能低下等。如何在心肌缺血后再灌时对心肌进行保护，从而减轻或者消除心肌缺血再灌注而引起的损伤，成为近年来研究的热点。

针刺可以有效的改善心脏的心肌缺血症状[10]，对于针刺是否能够改善心肌缺血再灌注损伤，近年来的实验研究也颇多，已有证明针刺预处理后，可以有效预防心肌缺血再灌注损伤对心脏造成的影响[11-13]。背俞穴是针灸临床常用来治疗脏腑疾病的一类特定穴，其中心俞和厥阴俞是治疗心脏疾病常用穴。既往的研究报道中，使用背俞穴治疗心肌缺血类疾病的临床报道居多[14-16]，而实验研究较少。

肿瘤坏死因子-α（Tumor Necrosis Factor, TNF-α）是一种能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性的细胞因子，是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的生物活性因子之一，具有广泛生物学效应，参与多种心血管疾病的发生、发展过程，其在心肌缺血再灌注损伤中具有重要作用。在正常情况下，TNF-α的产生仅在心肌间质的巨噬细胞中；当心肌受损时，心肌中TNF-α含量明显增加。

细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是体内重要的细胞活性分子，参与了机体免疫过程及炎症反应。作为免疫球蛋白超家族的成员ICAM-1，在心肌细胞在正常情况下仅表达极少量，但在某些因素如心脏移植排斥反应、缺血再灌注及TNF-α等细胞因子的作用下，ICAM-1的表达量则可大幅增加。

本实验通过建立心肌缺血再灌注损伤大鼠，分别将治疗组、阳性对照组和阴性对照组针刺不同天数后血清TNF-α、ICAM-1含量，与假手术组、模型组进行对比分析，研究电针心俞、厥阴俞对MIRI大鼠血清炎症因子的影响。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 动物

实验动物采用Wistar大鼠80只，由ft东鲁抗医药公司提供，200g～250g成年大鼠，雌雄各半。动物合格证号：SCXK(鲁) 20080002。每笼8只饲养，饲养环境为室温20～25℃，湿度60～65%，每12小时供食一次，自由饮水摄食。

### 1.1.2 实验器材

BL-420E生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）；HX-200动物呼吸机（成都泰盟科技有限公司）；

手术操作主要使用眼科手术器械，包括1/2弧3×4圆形手术缝合针，5/0号缝合线，兔开睑器，眼科手术剪，弯头无齿镊，小持针器。

华佗牌针灸针。

### 1.1.3 实验试剂4%水合氯醛。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与造模

#### 1.2.1.1 分组

将大鼠随机分为10组，每组8只，见表 1

表 1 大鼠分组

Ⅰ组（电针治疗3d）Ⅱ组（电针治疗7d）

假手术组Ⅰ假手术组Ⅱ

模型组Ⅰ模型组Ⅱ

治疗组Ⅰ治疗组Ⅱ

阳性对照组Ⅰ阳性对照组Ⅱ

阴性对照组Ⅰ阴性对照组Ⅱ

#### 1.2.1.2 造模方法

大鼠用4%水合氯醛腹腔注射，做全身麻醉，仰卧固定在鼠台上，接泰盟BL-420E生物机能实验系统进行心脏监护。颈胸部去毛，碘伏消毒手术视野，行口腔目视下插入气管法（将输液器的细软管针头剪下，软管内插一根细铜丝，捏住大鼠舌头，将大鼠口腔最大程度打开，将带金属线的细软管沿大鼠上颚轻轻插入，因气管有会厌软骨覆盖，所以插入时有轻微阻抗感，当软管以进入口中7～8cm后，将软管中的铜丝抽掉，用以棉絮放置软管的外口出，若见到棉絮随大鼠的呼吸飘荡，说明已插入气管，

否则为插入食管，可以拔出软管，再次操作，直到插入气管中）接动物呼吸机，潮气量5～6 mL/100g，呼吸频率70次/min，吸呼比1: 2。胸部去毛，于正中线左边约

1cm处作约2cm长的纵向切口，钝性分离胸大肌，暴露肋骨，小心于第4、5肋之间做横向切口约2cm，在切口处放置两块生理盐水浸泡过的小纱布，将兔开睑器沿肋骨方向放入，轻轻撑开开睑器，充分暴露心脏。这时将大鼠的左下肢松开，固定于大鼠右上肢处，使大鼠腹部向右侧翻转（如图1）。用小圆弯镊剥脱心包，使左心耳与动脉圆锥之间的静脉清晰可见，以此为标志进行结扎。用眼科针于左心耳下方约2 mm处进针，穿5/0号缝合线，在穿线处置一硅胶管结扎左前降支，迅速将心脏复位。止血钳关闭胸腔，心电监护示ST-T抬高，20min后打开胸腔，剪开硅胶管，恢复左前降支灌注，心脏复位，将切口逐层缝合，用针筒抽出胸腔气体，呼吸机维持呼吸30min后，拔掉气管插管。假手术组仅穿线，不结扎。待动物苏醒后，置小笼中单独饲养 1

天，术后第2天放回原笼中饲养。



图 1 大鼠手术开胸体位示意图

### 1.2.2 实验方法

假手术组：只穿线，不对冠脉进行结扎。术后不进行治疗。Ⅰ组术后4天取标本；

Ⅱ组术后8天取标本。

模型组：造模成功后置于笼中饲养，于术后第2天开始，每天于针刺用鼠架上绑

定30 min。Ⅰ组术后4天取标本；Ⅱ组术后8天取标本。

治疗组：术后第2天开始治疗。参照中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》取双侧心俞、厥阴俞针刺，选用30号，0.5寸（φ0.30mm, 13mm）针

灸针针刺，进针6mm，接HANS-100型韩氏镇痛仪，每组电极接同侧的穴位，疏密波，强度1 mA，刺激量2/15Hz，留针30 min。Ⅰ组连续治疗3天；Ⅱ组连续治疗7天。

阳性对照组：术后第2天开始针刺。取双侧内关针刺，选用30号，0.5寸（φ

0.30mm，13mm）针灸针针刺，进针1mm，接HANS-100型韩氏镇痛仪，疏密波，强度1 mA，刺激量2/15Hz，留针30 min。Ⅰ组连续治疗3天；Ⅱ组连续治疗7天。

阴性对照组：术后第2天开始针刺。取双侧阳陵泉穴，针刺方法同治疗组。Ⅰ组

连续治疗3天；Ⅱ组连续治疗7天。1.2.3.取材

#### 1.2.3.1 取材时间：

假手术组I、模型组I、治疗组I、阳性对照组I和阴性对照组I分别于术后第

4天取材；

假手术组II、模型组II、治疗组II、阳性对照组II和阴性对照组II分别于术后第8天取材。

#### 1.2.3.2 取材方法

将大鼠麻醉，从下腔静脉缓慢取血5 mL，置于标记好的试管中，室温静止30min，

3000转离心10min取血清，-20℃冷冻待测。

# 2 观察指标及检测方法

## 2.1 观察指标

用酶联免疫分析法（ELISA）检测大鼠血清ICAM-1、TNF-α含量。

## 2.2 检测方法



分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步骤操作相同）、标准品孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品孔中加入稀释好的标准品 50ul；待测样品孔中先加样品稀释液 40 ul， 然后加待测样品 10 ul（样品最终稀释度为 5 倍）。加样时应将样品加于酶标板底部，轻轻晃动混匀，尽量避免起泡。

稀释标准品

加 样

加盖或用用封板膜封板后，置 37℃温育 30 分钟。

将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 30 倍后备用。

小心揭去封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满稀释后洗涤液，

震荡 30 秒后弃去洗涤液，如此重复 5 次，用吸水纸拍干。

除空白孔外，每孔加入酶标试剂 50 ul，轻轻晃动混匀。

温 育

配 液

洗 涤

加 酶

温 育

洗 涤

显 色

每孔先加入显色剂 A50 ul，再加入显色剂 B50 ul，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。

终 止

取出酶标板后每孔加终止液 50 ul，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

测 定

测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。以空白孔调零，在

450nm 波长下依序测量各孔的吸光度值（OD 值）。

计 算

以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，再根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度。由于样品为稀释过的，其实际浓度应乘以总稀释倍数。

# 3 统计学方法

各组数据以*x*±s表示，采用SPSS13.0统计学软件。多组间比较采用单因素方差分析（One Way ANOVA）,两组间比较用两个独立样本的t检验（One-Samples*t*-Test）。以P＜0.05为有统计学差异。

# 4 实验结果与分析

## 4.1 Ⅰ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量比较

术后4天，其他各组大鼠血清中的TNF-α、ICAM-1的含量均高于假手术组，经比较有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注手术使大鼠血清中的炎性因子

TNF-α、ICAM-1含量增高。治疗组、阳性对照组和阴性对照组的TNF-α、ICAM-1的含量与模型组比较，无统计学异（P＞0.05）。阳性对照组和阴性对照组与治疗组比较TNF-α、ICAM-1的含量均无统计学差异（P＞0.05）（见表2，图2、图3）。

表 2 Ⅰ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量（*x*士S）

| 组别 | n | TNF-α(ng\*L-1) | ICAM-1(ng\*L-1) |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组Ⅰ | 8 | 45.15±3.43 | 29.61±1.15 |
| 模型组Ⅰ | 8 | 57.25±9.03\* | 36.95±3.89\* |
| 治疗组Ⅰ | 8 | 60.79±12.51\* | 35.11±4.04\* |
| 阳性对照组Ⅰ | 8 | 55.37±10.55\* | 35.87±3.95\* |
| 阴性对照组Ⅰ | 8 | 63.05±13.07\* | 38.13±5.26\* |
| （与假手术组相比，\* | P＜0.05) |  |  |



图 2 Ⅰ组大鼠血清中**TNF-α含量**（与假手术组相比，\* P＜0.05）



图 3 Ⅰ组大鼠血清中**ICAM-1含量**（与假手术组相比，\* P＜0.05）

## 4.2 Ⅱ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量比较

术后8天，其他各组大鼠血清中的TNF-α、ICAM-1的含量均高于假手术组，经比较有统计学差异（P＜0.05），表明术后8天，心肌缺血再灌注手术造成的血清中的炎性因子TNF-α、ICAM-1仍增高。治疗组、阳性对照组的TNF-α、ICAM-1的含量低于模型组，有统计学差异（P＜0.05）。治疗组与阳性对照组比较TNF-α、ICAM-1的含量无统计学差异（P＞0.05），而治疗组TNF-α、ICAM-1的含量低于阴性对照组，有统计学差异（P＜0.05），阴性对照组与模型组比较无统计学差异（P＞0.05）（见表3，图4、图5）。

表 3 Ⅱ组大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量（*x*士S）

| 组别 | n | TNF-α(ng\*L-1) | ICAM-1(ng\*L-1) |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组Ⅱ | 8 | 44.67±3.31 | 27.35±4.24 |
| 模型组Ⅱ | 8 | 58.21±10.09△ | 37.27±6.40△ |
| 治疗组Ⅱ | 8 | 49.03±4.80△﹡ | 32.27±3.81△﹡ |
| 阳性对照组Ⅱ | 8 | 49.41±4.31△﹡ | 32.74±4.29△﹡ |
| 阴性对照组Ⅱ | 8 | 59.34±10.21△＃ | 37.08±1.98△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05，；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 4 Ⅱ组大鼠血清中**TNF-α含量**

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 5 Ⅱ组大鼠血清中**ICAM-1**含量

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

## 4.3 Ⅰ组与Ⅱ组TNF-α含量的比较

Ⅰ组与Ⅱ组TNF-α含量的相比，假手术组、模型组、阴性对照组均无统计学差异（P＞0.05），治疗组和阳性对照组TNF-α含量Ⅱ组均低于Ⅰ组，经统计学分析有

差异（P＜0.05），说明电针心俞、厥阴俞和电针内关穴针刺7天比针刺3天血清TNF-α含量降低（见表4，图6）。

表 4 Ⅰ组与Ⅱ组血清TNF-α含量（*x*士S）（﹡P＜0.05）

| 组别 | n | Ⅰ组 | Ⅱ组 |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组 | 8 | 45.15±3.43 | 44.67±3.31 |
| 模型组 | 8 | 57.26±9.03 | 58.21±10.09 |
| 治疗组 | 8 | 60.79±12.51 | 49.03±4.80﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 55.38±10.55 | 49.41±4.30﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 63.05±13.07 | 59.34±10.21 |



图 6 Ⅰ组与Ⅱ组TNF-α含量的比较（\*P＜0.05）

## 4.4 Ⅰ组与Ⅱ组ICAM-1含量的比较

Ⅰ组与Ⅱ组ICAM-1含量的相比较，假手术组、模型组、阴性对照组均无统计学差异，治疗组和阳性对照组ICAM-1含量Ⅱ组均低于Ⅰ组，但无统计学差异（P＞0.05, 见表5, 图7）。

表 5 Ⅰ组与Ⅱ组血清ICAM-1含量（*x*士S）（P> 0.05，无统计学意义）

| 组别 | n | 术后 4 天 | 术后 8 天 |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组 | 8 | 29.61±1.15 | 27.35±4.24 |
| 模型组 | 8 | 36.95±3.89 | 37.27±6.40 |
| 治疗组 | 8 | 35.11±4.04 | 32.27±3.81 |
| 阳性对照组 | 8 | 35.87±3.95 | 32.74±4.29 |
| 阴性对照组 | 8 | 38.13±5.26 | 37.07±1.98 |



图 7 Ⅰ组与Ⅱ组血清ICAM-1含量（P> 0.05，无统计学意义）

从实验结果可以看出，大鼠心肌缺血再灌注造模成功后，血清中TNF-α、ICAM-1的含量升高。针刺3天，电针组治疗组和阳性对照组与模型组有下降趋势，但无统计学差异，针刺7天后电针组治疗组和阳性对照组与模型组比较血清中TNF-α、ICAM-1则明显降低。说明电针背俞穴治疗能减轻炎性因子TNF-α、ICAM-1的生成，抑制炎症反应，减轻心肌细胞损伤，从而发挥保护心肌的作用。通过组间比较，我们还发现，虽然电针背俞穴在针刺7天后，有效降低了血清中TNF-α、ICAM-1的含量，但针刺

7天和针刺3天时比较，TNF-α的含量明显降低，而ICAM-1的含量下降较缓慢，经比较无统计学性差异。说明电针背俞穴对MIRI大鼠血清中ICAM-1含量的影响是一个持续、缓慢过程；而对TNF-α含量的影响主要是在针刺3天以后发生的。

# 实验二电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响

大量报道证明，心肌细胞凋亡可能是MIRI机制中的重要环节之一。有实验研究表明，不同时间的心肌缺血再灌注损伤可导致心肌细胞凋亡[17]。Chakrabarti等在大鼠离体心脏灌注模型实验中发现心肌缺血10min即可出现心肌细胞凋亡[18]。心肌细胞凋亡加重心脏的缺血再灌注损伤，抑制心肌细胞凋亡可有效缓解心肌缺血再灌注损伤的作用。

本实验通过对假手术组、模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组针刺不同天数后，大鼠心肌细胞凋亡指数（Apoptosis index, AI）的检测及对比分析，研究电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 动物

本实验实验动物采用Wistar大鼠80只，由ft东鲁抗医药公司提供，200g～250g成年大鼠，雌雄各半。动物合格证号：SCXK(鲁) 20080002。每笼8只饲养，饲养环境为室温20～25℃，湿度60～65%，每12h供食一次，自由饮水摄食。

### 1.1.2 实验器材

BL-420E生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）；HX-200动物呼吸机（成都泰盟科技有限公司）；

BX51T-PHD-J11显微镜（日本奥林巴斯）CMOS（日本奥林巴斯）

Image-Pro Plus多功能真彩色细胞图象分析管理系统（美国Media Cybernetics公司）

RM2015切片机（德国莱卡）

LDZ5-2型离心机（北京离心机厂）

AE100型电子天平（瑞士METTER）移液器（德国EPPENDORF）

MIR-153型干燥箱（日本三洋）MDF-382E型低温冰箱（日本三洋）

DSHZ-300型恒温水浴箱（江苏太仓医用仪器厂）

YWY781B型医用微波炉（浙江临安爱迪仪器厂）

手术操作主要使用眼科手术器械，包括1/2弧3×4圆形手术缝合针，5/0号缝合线，兔开睑器，，眼科手术剪，弯头无齿镊，小持针器。

华佗牌针灸针。

### 1.1.3 实验试剂 4%水合氯醛；4%多聚甲醛；

原位细胞凋亡检测试剂盒（瑞士罗氏公司）；

DAB检测试剂盒（购于河北博海生物工程有限公司）

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与造模

动物的分组及造模方法同实验一。

### 1.2.2 实验方法

动物的分组及造模方法同实验一。1.2.3.取材

#### 1.2.3.1 取材时间：

假手术组I、模型组I、治疗组I、阳性对照组I和阴性对照组I分别于术后第

4天取材；假手术组II、模型组II、治疗组II、阳性对照组II和阴性对照组II分别于术后第8天取材。

#### 1.2.3.2 取材方法

心脏灌流取材。大鼠4%水合氯醛腹腔麻醉后，将大鼠仰卧固定于蜡盘上，排空灌流泵管道内气泡。暴露胸腔和腹腔，打开心包，暴露心脏。将灌流针于心尖部插入左心室，用止血钳固定，然后剪开右心耳，可见静脉血流出。打开灌流泵，先灌注35-37℃的0.9%NaCl，速度50 rmp，将心脏及血管内的血液冲干净，以肝脏变白为准。然后再灌注4℃预冷的4%多聚甲醛固定液，速度先快后慢，开始以50rmp速度灌注

5min后改为30rmp灌注10分钟，取下心脏，置于4%多聚甲醛固定液中固定。

# 2 观察指标及检测方法

## 2.1 观察指标

用原位末端标记法（TUNEL）检测大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）。

## 2.2 检测方法

石蜡包埋的切片的预处理常规脱蜡脱水。

用蛋白酶K（20μg/ml溶于Tris/HCl中，Ph7.4～8.0）室温孵育15～30分钟。

37度孵育15分钟。PBS洗2次。

标记：PBS冲洗2次，擦干样品周围的水，滴加50ul的TUNEL反应混合溶液，在湿盒中37℃孵育60分钟（为防止蒸发和保证TUNEL反应混合物均匀分布，在孵育过程中加盖盖玻片）。PBS冲洗3次，至此样品可在荧光镜下分析结果。

信号转化和分析：擦干样品周围的水分，加入50ul转化剂-POD，在湿盒中37℃孵育30分钟（为防止蒸发和保证转化剂-POD均匀分布，在孵育过程中加盖盖玻片）。PBS冲洗3次，加入50～100μl DAB底物溶液，室温孵育10分钟，PBS冲洗3次。

苏木素复染细胞核，封片，在光镜下图象分析：选择有意义的组织相，经登录、编号、采集、分析、读取数据、最后存盘。

# 3 统计学方法

各组数据以*x*±s表示，采用SPSS13.0统计学软件。多组间比较采用单因素方差分析（One Way ANOVA）,两组间比较用两个独立样本的t检验（One-Samples*t*-Test）。以P＜0.05为有统计学差异。

# 4 实验结果与分析

## 4.1 Ⅰ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）

治疗组、阳性对照组、阴性对照组和模型组中心肌细胞AI高于假手术组，分析有统计学差异（P＜0.05, 见表6, 图8），表明心肌缺血再灌注可引起细胞凋亡。治疗组、阳性对照组与模型组比较心肌细胞AI低于模型组，经统计学分析有差异（P

＜0.05），表明电针心俞、厥阴俞和内关穴可抑制心肌细胞凋亡。阴性对照组与模型组比较，无统计学差异（P＞0.05），表明电针阳陵泉穴对心肌细胞的凋亡抑制不明显；治疗组和阳性对照组心肌细胞AI无明显差异（P＞0.05），说明电针心俞、厥阴俞穴和内关穴对缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用相当。

表6 各组大鼠心肌细胞AI（*x*±s）



| 组别 | 例数 | Ⅰ组心肌细胞 AI( | ) | Ⅱ组心肌细胞 AI（ ） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 假手术 | 8 | 1.37±0.59 |  | 1.42±0.47 |
| 模型组 | 8 | 13.57±1.62△ |  | 19.04±2.01△ |
| 治疗组 | 8 | 6.04±1.35△﹡ |  | 8.76±1.54△﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 7.95±1.68△﹡ |  | 9.35±1.35△﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 15.05±1.71△＃ |  | 18.47±1.23△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图8 Ⅰ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

## 4.2 Ⅱ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）

治疗组、阳性对照组、阴性对照组和模型组AI高于假手术组，经分析有统计学差异（P＜0.05, 见表6, 图9）；治疗组、阳性对照组与模型组相比低于模型组，经统计学分析有差异（P＜0.05），表明电针心俞、厥阴俞穴和内关穴可抑制心肌细胞凋亡。阴性对照组与模型组比较，无明显差异（P＞0.05），表明电针阳陵泉穴对心肌细胞的凋亡抑制不明显；治疗组和阳性对照组AI无明显差异（P＞0.05），说明电针心俞、厥阴俞穴和内关穴对缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用相当。



图9 Ⅱ组大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

## 4.3 Ⅰ组与Ⅱ组相大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）的比较

Ⅰ组与Ⅱ组相比较，阴性对照组和模型组心肌细胞凋亡指数（AI）Ⅱ组均高于Ⅰ组，有统计学差异（P＜0.05, 见图10），而治疗组、阳性对照组心肌细胞凋亡指数

（AI）Ⅱ组与Ⅰ组相比较无统计学差异（P＞0.05），表明心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌细胞凋亡持续存在，针刺7天仍然有效。



图10 Ⅰ组与Ⅱ组相大鼠心肌细胞凋亡指数（AI）的比较（\*P＜0.05）

## 4.4 大鼠心肌细胞凋亡病理表现

正常心肌细胞核蓝染，凋亡的心肌细胞可见核呈棕黄色，染色质凝聚，浓缩。（如图11）



**3d**

**7d**

图 11 大鼠心肌细胞凋亡（×400）

经苏木素染色后，在假手术组中，TUNEL阳性细胞很少，相反，在模型组心肌切片中，呈现大量TUNEL阳性细胞，核呈棕黄色反应，核内染色质浓缩，形成密集颗粒位于核膜下，有的胞核被降解，胞浆不着色。治疗组、阳性对照组可见散在的阳性细胞，阴性对照组心肌切片中也可见大量TUNEL阳性细胞。

本实验中，其他各组细胞凋亡指数远远大于假手术组，可见如果没有行冠脉结扎再灌术，即使开胸，在心肌上穿刺（假手术组只穿线，不结扎）也不会引起心肌细胞大量凋亡，而正常的心肌细胞中会存在少量细胞凋亡。实验结果显示，造模后的各组，无论是否治疗，术后8天其细胞凋亡的表达高于术后4天。电针背俞穴，心肌细胞凋

亡指数虽然针刺7天（8.746±1.545）高于针刺3天（6.046±1.348），亦呈现出心肌细胞持续凋亡的趋势，但各自都低于模型组，显然电针背俞可以抑制心肌细胞的凋亡，而且这种治疗持续有效，提示我们临床治疗时应长期针刺，而不能仅仅针刺1天就结束治疗。

# 实验三电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡调控因素的影响

细胞凋亡的发生机制颇为复杂，多种基因、细胞因子及细胞内小分子都对细胞凋亡产生相应的作用。目前学术界认为，心肌细胞凋亡与线粒体丝氨酸蛋白酶(high temperature requirementA2, HtrA2)、Fas与FasL及P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)等内源性因素参与的细胞信号传导密切相关[19]。

本实验通过对假手术组、模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组针刺不同天数后，大鼠心肌细胞凋亡相关因素Fas、FasL、HtrA2及P38MAPK的检测及对比分析，研究电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 动物

本实验实验动物采用Wistar大鼠80只，由ft东鲁抗医药公司提供，200g～250g成年大鼠，雌雄各半。动物合格证号：SCXK(鲁) 20080002。每笼8只饲养，饲养环境为室温20～25℃，湿度60～65%，每12h供食一次，自由饮水摄食。

### 1.1.2 实验器材

BL-420E生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）；HX-200动物呼吸机（成都泰盟科技有限公司）；

BX51T-PHD-J11显微镜（日本奥林巴斯）CMOS（日本奥林巴斯）

Image-Pro Plus多功能真彩色细胞图象分析管理系统（美国Media Cybernetics公司）

RM2015切片机（德国莱卡）

LDZ5-2型离心机（北京离心机厂）

AE100型电子天平（瑞士METTER）移液器（德国EPPENDORF）

MIR-153型干燥箱（日本三洋）MDF-382E型低温冰箱（日本三洋）

DSHZ-300型恒温水浴箱（江苏太仓医用仪器厂）

YWY781B型医用微波炉（浙江临安爱迪仪器厂）

手术操作主要使用眼科手术器械，包括1/2弧3×4圆形手术缝合针，5/0号缝合线，兔开睑器，，眼科手术剪，弯头无齿镊，小持针器。

华佗牌针灸针。

### 1.1.3 实验试剂 4%水合氯醛；4%多聚甲醛；

免疫组化试剂：多聚赖氨酸、一抗、SP、DAB（购于河北博海生物工程开发有限

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 公司），其中一抗如表 7. | 表 7 | 免疫组化一抗试剂 |  |
| 名称 |  | 厂家 | 货号 |
| Fas  FasL |  | 中杉  中杉 | SP-9001  Sc-834 |
| HtrA2 抗体  P38MAPK 抗体 |  | 博奥森  博奥森 | bs-1271R  bs-0637R |

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与造模

动物的分组及造模方法同实验一。

### 1.2.2 实验方法

动物的分组及造模方法同实验一。1.2.3.取材

#### 1.2.3.1 取材时间：

假手术组I、模型组I、治疗组I、阳性对照组I和阴性对照组I分别于术后第

4天取材；假手术组II、模型组II、治疗组II、阳性对照组II和阴性对照组II分别于术后第8天取材。

#### 1.2.3.2 取材方法

心脏灌流取材。大鼠4%水合氯醛腹腔麻醉后，将大鼠仰卧固定于蜡盘上，排空灌流泵管道内气泡。暴露胸腔和腹腔，打开心包，暴露心脏。将灌流针于心尖部插入左心室，用止血钳固定，然后剪开右心耳，可见静脉血流出。打开灌流泵，先灌注

35～37℃的0.9%NaCl，速度50 rmp，将心脏及血管内的血液冲干净，以肝脏变白为准。然后再灌注4℃预冷的4%多聚甲醛固定液，速度先快后慢，开始以50rmp速度灌注5min后改为30rmp灌注10分钟，取下心脏，置于4%多聚甲醛固定液中固定。

# 2 观察指标及检测方法

## 2.1 观察指标

用免疫组化法检测大鼠心肌Fas、FasL、HtrA2及P38MAPK的蛋白阳性水平指数

（PLI）。

## 2.2 检测方法

取材：取实验组和对照组动物组织尽可能新鲜，PBS（磷酸盐缓冲液）洗，取小于

0.5cm×0.5cm×0.1cm组织块。

固定和包埋：用4%多聚甲醛（0.1MPBS, PH7.0～7.6, 含0.1%DEPC）进行固定，经70%乙醇30分钟、80%乙醇30分钟、90%乙醇30分钟两次、95%乙醇30分钟两次、100%

乙醇30分钟两次、二甲苯透明30分钟两次、55℃石蜡中30分钟两次、用铜制模具包埋组织块。

切片：将厚度5um的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上，60℃过夜。脱蜡、入水：将切片浸于二甲苯中5分钟两次、100%乙醇5分钟两次、95%乙醇

5分钟两次、90%乙醇5分钟两次、85%乙醇5分钟两次、75%乙醇5分钟两次、自来水冲洗、PBS洗两次。

1%甲醇双氧水，室温10分钟，蒸馏水洗1次,0.1MPBS洗3次×5分钟。切片上滴加抗原修复液，室温10分钟，0.1MPBS洗3次×5分钟。

切片上滴加正常ft羊血清封闭液，室温20分钟。甩去多余液体，不洗。切片上滴加第一抗体，4℃过夜，0.1MPBS洗3次×5分钟。

切片上滴加生物素化第二抗体（IgG），37℃20分钟，0.1MPBS洗3次×5分钟。切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液（S-A/HRP），37℃20分钟，0.1MPBS

洗3次×5分钟。

DAB显色：使用DAB显色试剂盒1ml蒸馏水加显色剂A、B、C各一滴，混匀，加至标本上，显色6分钟，充分水洗。

苏木素复染细胞核1分钟，充分水洗、1%盐酸酒精分化、1%胺水反蓝、充分水洗、

经70%乙醇5分钟、80%乙醇5分钟、90%乙醇5分钟两次、95%乙醇5分钟两次、100%

乙醇5分钟两次脱水、二甲苯透明5分钟两次、中性树脂封片。

显微镜观察：选择阳性和阴性组织，显微照相（100×，400×）。

图象分析：用计算机图像处理系统每张切片（×400）随机选5个视野，显微图像分析仪测定阳性细胞百分率P／A（％）、平均光密度（AOD），并将前两者的乘积作为阳性水平指数（positivelevelindex, PLI）。

# 3 统计学方法

各组数据以*x*±s表示，采用SPSS13.0统计学软件。多组间比较采用单因素方差分析（One Way ANOVA）,两组间比较用两个独立样本的t检验（One-Samples*t*-Test）。以P＜0.05为有统计学差异。

# 4 实验结果与分析

4.1电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas、FasL的影响。

### 4.1.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas、FasL的表达

免疫组化ABC染色后, Fas与FasL蛋白表达阳性染色的细胞，其胞膜或胞浆呈棕黄色（见图11）。



图11 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas/FasL

假手术组仅见少数散在的Fas与FasL蛋白阳性染色细胞。模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组Fas与FasL蛋白阳性染色的细胞增加，胞浆着色增强。

### 4.1.2 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas和FasL PLI

#### 4.1.2.1 Ⅰ组大鼠心肌细胞Fas和FasL PLI

模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组大鼠心肌细胞中的Fas和FasL PLI均高于假手术组，经比较有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的Fas和FasL蛋白呈现高表达状态。治疗组、阳性对照组的Fas和FasL

PLI低于模型组，经统计学比较有差异（P＜0.05）。治疗组与阳性对照组比较Fas和FasL PLI无统计学差异（P＞0.05），而治疗组Fas和FasL PLI低于阴性对照组，有统计学差异（P＜0.05），阴性对照组与模型组比较无统计学性差异（P＞0.05）（见表8，图12、13）。

表 8 Ⅰ组大鼠心肌细胞Fas、FasL PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Fas PLI | FasL PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组Ⅰ | 8 | 9.73±1.49 | 10.59±1.14 |
| 模型组Ⅰ | 8 | 72.00±1.26△ | 69.60±0.97△ |
| 治疗组Ⅰ | 8 | 61.04±1.00△﹡ | 35.01±1.04△﹡ |
| 阳性对照组Ⅰ | 8 | 60.42±0.93△﹡ | 28.54±1.33△﹡ |
| 阴性对照组Ⅰ | 8 | 70.26±1.05△＃ | 57.33±1.53△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 12 Ⅰ组大鼠心肌细胞Fas PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 13 Ⅰ组大鼠心肌细胞FasL PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

#### 4.1.2.2 Ⅱ组大鼠心肌细胞Fas和FasL PLI

模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组大鼠心肌细胞中的Fas和FasL PLI均高于假手术组，经比较有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的Fas和FasL蛋白呈现高表达状态。治疗组、阳性对照组Fas和FasL PLI低于模型组，有统计学差异（P＜0.05），即治疗组与阳性对照组均有效降低。治疗组

与阳性对照组比较Fas和FasL PLI无统计学差异，而治疗组与阴性对照组比较Fas和FasL PLI较低，有统计学差异（P＜0.05）（见表9，图14、15）。

表 9 Ⅱ组大鼠心肌细胞Fas、FasL PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Fas PLI | FasL PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术Ⅰ | 8 | 10.23±2.19 | 10.51±1.34 |
| 模型组Ⅰ | 8 | 77.36±2.26△ | 89.89±2.57△ |
| 治疗组Ⅰ | 8 | 48.27±1.67△﹡ | 46.08±2.03△﹡ |
| 阳性对照组Ⅰ | 8 | 44.19±2.03△﹡ | 51.33±1.06△﹡ |
| 阴性对照组Ⅰ | 8 | 83.26±3.05△＃ | 77.33±3.53△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 14 Ⅱ组大鼠心肌细胞Fas

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 15 Ⅱ组大鼠心肌细胞FasL PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0.05，；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

#### 4.1.2.3 Ⅰ组与Ⅱ组Fas PLI的比较

Ⅱ组与Ⅰ组Fas PLI相比较，模型组、阴性对照组明显升高，经分析有统计学差异（P＜0.05），表明随着时间的推移，2组Fas蛋白表达增高。治疗组和阳性对照组Fas PLIⅡ组均低于Ⅰ组，经统计学分析有差异（P＜0.05），说明电针心俞、厥阴俞和电针内关穴针刺7天比针刺3天血清Fas蛋白表达降低。（见表10，图13）。

表10 Ⅰ组与Ⅱ组心肌细胞FasPLI（*x*士S）（﹡P＜0.05）

| 组别 | n | Ⅰ组 | Ⅱ组 |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术组 | 8 | 9.73±1.49 | 10.23±2.19 |
| 模型组 | 8 | 72.00±1.26﹡ | 77.36±2.26﹡ |
| 治疗组 | 8 | 61.04±1.00﹡ | 48.27±1.67﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 60.42±0.93﹡ | 44.19±2.03﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 70.26±1.05﹡ | 83.26±3.05﹡ |



图16 Ⅰ组与Ⅱ组心肌细胞Fas PLI比较（\*P＜0.05）

#### 4.1.2.4 Ⅰ组与Ⅱ组FasL PLI的比较

Ⅱ组与Ⅰ组FasL PLI相比较，模型组、阴性对照组明显升高（P＜0.05），表明随着时间的推移，Ⅱ组FasL蛋白表达增高。治疗组和阳性对照组FasL PLIⅡ组亦高于Ⅰ组，经统计学分析有差异（P＜0.05），说明电针心俞、厥阴俞和电针内关穴针刺7天比针刺3天血清FasL蛋白表达仍然升高。（见表11，图17）。

表11

Ⅰ组与Ⅱ组心肌细胞FasL

PLI（x士S）（﹡P＜0.05）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | n | Ⅰ组 Ⅱ组 |
| 假手术组 | 8 | 10.59±1.14 10.51±1.34 |
| 模型组 | 8 | 69.60±0.97﹡ 89.89±2.57﹡ |
| 治疗组 | 8 | 35.01±1.04﹡ 46.08±2.03﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 28.54±1.33﹡ 51.33±1.06﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 57.33±1.53﹡ 77.33±3.53﹡ |



图17 Ⅰ组与Ⅱ组心肌细胞FasL PLI的比较（\*P＜0.05）

## 4.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK的影响

### 4.2.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK的表达

免疫组化ABC染色后, P38MAPK蛋白阳性表达部位在胞浆和胞核内，呈棕黄色细颗粒（见图18）。



图15 P38MAPK蛋白阳性表达

假手术组可见大量的P38MAPK蛋白强阳性染色细胞。模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组P38MAPK蛋白阳性染色的细胞相对较少。

### 4.2.2 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK PLI

Ⅰ组与Ⅱ组中，模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组大鼠心肌细胞中的

P38MAPKPLI均低于假手术组，经比较有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的P38MAPK蛋白呈现低表达状态。治疗组、阳性对照组的

P38MAPKPLI高于模型组，有统计学差异（P＜0.05）。治疗组与阳性对照组比较P38MAPK PLI无统计学差异（P＞0.05），而治疗组与阴性对照组比较P38MAPKPLI较高，有统计学差异（P＜0.05），阴性对照组与模型组比较无统计学性差异（P＞0.05）

（见表12，图19、20）。

表 12 大鼠心肌细胞P38MAPK PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Ⅰ组 P38MAPK PLI | Ⅱ组 P38MAPK PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术 | 8 | 93.9±6.41 | 77.16±5.30 |
| 模型组 | 8 | 28.48±7.8△ | 34.51±2.73△ |
| 治疗组 | 8 | 41.74±2.09△﹡ | 59.10±4.16△﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 58.84±4.00△﹡ | 65.34±5.04△﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 33.89±2.31△＃ | 37.41±4.53△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图19 Ⅰ组大鼠心肌细胞P38MAPK PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

29



图20 Ⅱ组大鼠心肌细胞P38MAPK PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

Ⅰ组与Ⅱ组相比较，模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组P38MAPK PLIⅡ组高于Ⅰ组，经统计学分析有差异（P＜0.05），表明Ⅱ组P38MAPK PLI蛋白表达增高，说明电针心俞、厥阴俞和电针内关穴针刺7天比针刺3天P38MAPK蛋白表达升高。（见图21）



图 21 Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞P38MAPK PLI的比较（﹡P＜0. 05）

## 4.3 电针心俞、厥阴俞对肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2的影响

### 4.3.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2的表达



图 22 HtrA2蛋白阳性（HtrA2蛋白阳性表达部位在胞浆，呈棕黄色细颗粒）

假手术组仅见少数散在的HtrA2蛋白阳性染色细胞。模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组HtrA2蛋白阳性染色的细胞数目增多，阳性表达增强。

### 4.3.2 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2 PLI

Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞中的HtrA2 PLI，经统计学比较，模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组高于假手术组（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的HtrA2蛋白表达升高。治疗组、阳性对照组与模型组比较，HtrA2 PLI均低于模型组（P＜0.05）。治疗组与阳性对照组HtrA2 PLI比较，无统计学差异（P＞0.05），而治疗组与阴性对照组比较，HtrA2 PLI低于阴性对照组，有统计学差异（P

＜0.05），阴性对照组与模型组比较无统计学性差异（见表13，图23、24）。

表13 大鼠心肌细胞HtrA2 PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Ⅰ组 HtrA2PLI | Ⅱ组 HtrA2PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术 | 8 | 19.07±2.11 | 18.97±1.40 |
| 模型组 | 8 | 49.73±4.67△ | 58.30±5.09△ |
| 治疗组 | 8 | 39.83±3.41△﹡ | 37.33±3.04△﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 36.28±2.70△﹡ | 38.40±3.99△﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 47.98±3.18△＃ | 51.31±4.11△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 23 Ⅰ组大鼠心肌细胞HtrA2 PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 24 Ⅱ组大鼠心肌细胞HtrA2 PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

Ⅰ组与Ⅱ组相比较，模型组和阴性对照组HtrA2 PLIⅡ组高于Ⅰ组，有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤大鼠的HtrA2持续增高；电针阳性对照组HtrA2 PLIⅡ组高于Ⅰ组，但无统计学意义（P＞0.05）；电针治疗组HtrA2 PLIⅡ组低于Ⅰ组，无统计学差异（P＞0.05），说明电针背俞穴针刺7天比针刺3天血清HtrA2蛋白表达量相当。（见图25）。



图 25 Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞HtrA2 PLI比较(\*P＜0. 05)

在本实验中，通过假手术组和模型组的比较，可以看出心肌缺血再灌注后大鼠心肌细胞Fas和FasL蛋白表达增加，由此促进了细胞凋亡的发生，电针心俞、厥阴俞后，无论针刺3天还是针刺7天，Fas和FasL的表达均低于模型组，可见电针心俞、厥阴俞可以抑制Fas和FasL的表达，减轻Fas / FasL对心肌细胞凋亡的诱导作用。通过不同时间段的比较，心肌缺血再灌注后数天，模型组的Fas和FasL的蛋白表达指数的升高，则其此带动的细胞凋亡和心肌的损害仍然存在，并有可能加重。随着电针心俞、厥阴俞次数的增加，Fas的含量呈现降低趋势，但FasL的含量依然升高，可见心俞、厥阴俞对Fas的抑制效果明显，从而对Fas / FasL的表达产生抑制作用，而FasL表达的增加。

本研究中，术后假手术组的P38MAPK呈高表达状态，其他各组均低于假手术组，治疗组的P38MAPK PLI高于模型组，可见在心肌缺血再灌注时，可能P38MAPK被大量消耗，而电针心俞、厥阴俞促进了P38MAPK的表达，使其发挥对心脏的保护作用。针刺7天后P38MAPK PLI高于针刺3天，可见随着针刺的次数，P38MAPK增加，进一步保护心脏。

本研究中电针心俞、厥阴俞通过抑制HtrA2的表达有效减轻了心肌缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡。

# 实验四电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠5-LOX和CYP450的影响

由于引起心肌缺血再灌注损伤的机制相当复杂，所以存在氧自由基损伤学说、细胞内Ca2+超载学说、炎性因子学说、酸中毒学说多种学说，而机体中某些内源性蛋白酶在心肌缺血再灌注损伤中也是通过复杂的，多通路的，协同或者拮抗的机理发挥了重要作用。针刺是一种良性的外源性刺激，对这些酶的在心肌缺血再灌注损伤中发挥作用亦产生了影响。

本实验，通过研究电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、细胞色素P450单氧化酶(cytochrome P450

monooxygenase，CYP450）的影响，探讨针刺对在心肌缺血再灌注损伤中发挥复杂机理的酶产生何种作用。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 动物

本实验实验动物采用Wistar大鼠80只，由ft东鲁抗医药公司提供，200g～250g成年大鼠，雌雄各半。动物合格证号：SCXK(鲁) 20080002。每笼8只饲养，饲养环境为室温20～25℃，湿度60～65%，每12h供食一次，自由饮水摄食。

### 1.1.2 实验器材

BL-420E生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）；HX-200动物呼吸机（成都泰盟科技有限公司）；

BX51T-PHD-J11显微镜（日本奥林巴斯）CMOS（日本奥林巴斯）

Image-Pro Plus多功能真彩色细胞图象分析管理系统（美国Media Cybernetics公司）

RM2015切片机（德国莱卡）

LDZ5-2型离心机（北京离心机厂）

AE100型电子天平（瑞士METTER）移液器（德国EPPENDORF）

MIR-153型干燥箱（日本三洋）MDF-382E型低温冰箱（日本三洋）

DSHZ-300型恒温水浴箱（江苏太仓医用仪器厂）

YWY781B型医用微波炉（浙江临安爱迪仪器厂）

手术操作主要使用眼科手术器械，包括1/2弧3×4圆形手术缝合针，5/0号缝合线，兔开睑器，，眼科手术剪，弯头无齿镊，小持针器。

华佗牌针灸针。

### 1.1.3 实验试剂 4%水合氯醛；4%多聚甲醛；

免疫组化试剂：多聚赖氨酸、SP、DAB（购于河北博海生物工程开发有限公司）；5-LOX抗体，博奥森，货号bs-0526R；

CYP450抗体，博奥森，货号bs-0461R。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与造模

动物的分组及造模方法同实验一。

### 1.2.2 实验方法

动物的分组及造模方法同实验一。1.2.3.取材

#### 1.2.3.1 取材时间：

假手术组I、模型组I、治疗组I、阳性对照组I和阴性对照组I分别于术后第

4天取材；

假手术组II、模型组II、治疗组II、阳性对照组II和阴性对照组II分别于术后第8天取材。

#### 1.2.3.2 取材方法

心脏灌流取材。大鼠4%水合氯醛腹腔麻醉后，将大鼠仰卧固定于蜡盘上，排空灌流泵管道内气泡。暴露胸腔和腹腔，打开心包，暴露心脏。将灌流针于心尖部插入左心室，用止血钳固定，然后剪开右心耳，可见静脉血流出。打开灌流泵，先灌注35-37℃的0.9%NaCl，速度50 rmp，将心脏及血管内的血液冲干净，以肝脏变白为准。然后再灌注4℃预冷的4%多聚甲醛固定液，速度先快后慢，开始以50rmp速度灌注

5min后改为30rmp灌注10分钟，取下心脏，置于4%多聚甲醛固定液中固定。

# 2 观察指标及检测方法

## 2.1 观察指标

用免疫组化法检测大鼠心肌5-LOX和CYP450蛋白阳性水平指数（PLI）。

## 2.2 检测方法

检测方法同实验四

# 3 统计学方法

各组数据以*x*±s表示，采用SPSS13.0统计学软件。多组间比较采用单因素方差分析（One Way ANOVA）,两组间比较用两个独立样本的t检验（One-Samples*t*-Test）。以P＜0.05为有统计学差异。

# 4 实验结果与分析

## 4.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX的影响

### 4.2.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX的表达

5-LOX蛋白阳性表达部位在胞浆和胞核内，呈棕黄色细颗粒（见图26）。



图26 5 -LOX蛋白阳性

假手术组仅见少数散在的5-LOX蛋白阳性染色细胞。模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组5-LOX蛋白阳性染色的细胞数量增多，蛋白表达阳性增强。

### 4.2.2 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX PLI

Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞中的5-LOX PLI，经统计学比较，模型组和阴性对照组高于假手术组（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的5-LOX蛋白表达升高。治疗组、阳性对照组的5-LOX PLI与假手术组比较无统计学差异，与模型组比较有统计学差异（P＜0.05）。治疗组与阳性对照组比较5-lox PLI无统计学差异

（P＞0.05），而治疗组与阴性对照组比较5-lox PLI较低，有统计学差异（P＜0.05），

阴性对照组与模型组比较无统计学性差异（P＞0.05）（见表14，图27、28）。

表 17 大鼠心肌细胞5-LOX PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Ⅰ组 5-LOX PLI | Ⅱ组 5-LOX PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术 | 8 | 32.00±2.73 | 38.46±3.20 |
| 模型组 | 8 | 68.13±5.46△ | 65.87±1.83△ |
| 治疗组 | 8 | 32.59±2.55﹡ | 39.25±3.45﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 35.32±4.18﹡ | 36.60±3.19﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 48.34±4.03△＃ | 47.68±4.02△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 27 Ⅰ组大鼠心肌细胞5-LOX PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 28 Ⅱ组大鼠心肌细胞5-LOX PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

Ⅰ组与Ⅱ组相比较，模型组和阴性对照组5-lox PLIⅡ组低于Ⅰ组，经统计学分析无差异（P＞0.05）；电针阳性对照组5-lox PLIⅡ组高于Ⅰ组，但无统计学意义（P

＞0.05）；治疗组5-lox PLIⅡ组高于Ⅰ组，有统计学差异（P＜0.05），说明电针背俞穴针刺7天比针刺3天5-lox蛋白表达升高（图29）。



图 29 Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞5-LOX PLI（\*P＜0.05）

## 4.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450的影响

### 4.2.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450的表达

CYP450蛋白阳性表达部位在胞浆和胞核内，呈棕黄色细颗粒（见图30）。



图30 CYP450蛋白阳性

假手术组仅见散在的CYP450蛋白阳性染色细胞。模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组CYP450蛋白阳性染色的细胞数目较多，染色增强。

### 4.2.2 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450 PLI

Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞中的CYP450 PLI，经统计学比较，模型组、治疗组、阳性对照组和阴性对照组高于假手术组，经分析有统计学差异（P＜0.05），表明心肌缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞中的CY治疗组与阳性对照组比较P450单氧化酶PLI无统计学差异（P＞0.05），而治疗组与阴性对照组比较P450单氧化酶PLI较低，有统计学差异（P＜0.05），阴性对照组与模型组比较无统计学性差异（P＞0.05）（见表15，图31、32）。

表 15 大鼠心肌细胞CYP450 PLI（*x*士S）

| 组别 | 例数 | Ⅰ组 CYP450PLI | Ⅱ组 CYP450PLI |
| --- | --- | --- | --- |
| 假手术 | 8 | 22.40±2.08 | 26.43±2.43 |
| 模型组 | 8 | 59.62±11.22△ | 54.92±6.07△ |
| 治疗组 | 8 | 41.95±4.20△﹡ | 34.66±2.19△﹡ |
| 阳性对照组 | 8 | 44.93±4.13△﹡ | 31.18±3.05△﹡ |
| 阴性对照组 | 8 | 59.18±5.28△＃ | 55.71±4.76△＃ |

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 31 Ⅰ组大鼠心肌细胞CYP450 PLI的比较

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）



图 32 Ⅱ组大鼠心肌细胞CYP450 PLI

（与假手术组比较，△P＜0.05；与模型组比较，﹡P＜0. 05；与治疗组比较，＃P＜0. 05）

Ⅰ组与Ⅱ组相比较，模型组和阴性对照组P450单氧化酶PLIⅡ组均低于Ⅰ组，但无统计学差异（P＞0.05）；治疗组、阳性对照组P450单氧化酶PLIⅡ组低于于Ⅰ组，有统计学差异（P＜0.05）；表明电针背俞穴针刺7天比针刺3天血清P450单氧化酶蛋白表达量降低。（见图33）。



图 33 Ⅰ组与Ⅱ组大鼠心肌细胞CYP450 PLI比较（\*P＜0.05）

本实验中，心肌缺血再灌注术后模型组大鼠的5-LOX表达升高。电针心俞、厥阴俞可以降低其含量，针刺4天后5-LOX表达已接近假手术组，针刺7天仍保持低表达量，说明心俞、厥阴俞，可以降低缺血再灌注后5-LOX的含量，从而起到保护心肌免受由5-LOX所引起的炎症反应侵害及降低5-LOX所造成的细胞凋亡。

治疗组细胞色素CYP450蛋白的表达低于模型组，说明电针心俞、厥阴俞可以降低细胞色素CYP450，发挥抗炎、抗氧化等作用从而减轻其对心肌的损伤。

# 讨论

# 1 选穴依据

诸多古代经典文献均指出背俞穴是脏腑之气输注于背腰部的俞穴，能调整相关脏腑功能，常用于治疗相关脏器病变。《灵枢・背俞》篇中载有五脏背俞穴的名称和位置。《素问・长刺节论》：“迫藏刺背，背俞也。”而《难经・六十七难》指出“阴病行阳，阳病行阴，……俞在阳。”《素问・阴阳应象大论》中“阴病治阳”均说明背俞穴可以治疗五脏的病症。心俞为心之背俞穴，《针灸甲乙经》中载有心俞穴主“寒热心痛，循循然，与背相引而痛”。厥阴俞又名“阙输”、“巨阙输”、“厥阴输”《内经》未见其名，但《素问・刺热篇》提到“热病气穴……四椎下间主隔中热”，其“四椎下间”即是指厥阴俞。《外台秘要》载有“主心痛，与背相引而痛。”

在治疗心肌缺血所导致的疾病时，临床选用最多的穴位是内关，内关在治疗心脏方面的疾患有很好的疗效，故大量的临床报道和实验研究的重点穴位为内关，而作为经典文献中指出治疗脏腑病的心俞、厥阴俞虽然临床报道较多，但进行实验研究和机理探讨的较少[20]，故本研究选取心俞、厥阴俞作为治疗组用穴。

内关穴作为研究用穴的重点，很多报道证实了其对心肌缺血再灌注损伤的治疗有效，故选取本穴作为阳性对照组。阳陵泉穴经文献报道和理论源流的证实，对于心脏类疾病无确切的疗效，故选取其为阴性对照组，以证明心俞、厥阴俞的治疗特异性。

# 2 现代医学对背俞穴作用机制的探讨

从解剖位置来看，背俞穴位于脊柱两旁的竖脊肌上，深层有脊神经后支的内侧皮支。脊神经后支自椎间孔处由脊神经分出后绕上关节突外侧向后行，其外侧支进入竖脊肌，内侧皮支分布背深肌和脊柱。脊柱两旁的交感干神经节借节间支连接成左右两条交感干神经，三十一对脊神经都与交感干之间联系。交感神经干交通支于脊神经的连接点在体表的投影与背俞穴密切相关。针刺背俞穴时，针尖经竖脊肌沿棘突两侧进入，可以刺激脊神经前支、后支及交感神经干。实验研究证明，对针刺而言，交感神经节后纤维的末梢释放肾上腺素一种最重要的儿茶酚胺。针刺背俞穴时刺激到交感神经节后纤维，此时正肾上腺素就会释放到周围的组织和靶器官中，从而强有力地抑制交感神经系统的功能。而且，针刺背俞穴还能引起乙酰胆碱的释放，使乙酰胆碱的活动增强而影响多组织、多器官的生理活动。由此可见，针刺背俞穴能影响交感神经末梢多种化学递质的释放，从而通过神经体液的调节影响各组织器官的生理功能。

从神经节段理论来看，背俞穴的分布规律与脊神经节段性分布大致吻合，同时内脏疾病的体表反应区常是相应穴位所在，针刺背俞穴是一种对身体的良性刺激，其作用于躯体感觉神经末梢及交感神经末梢，通过神经的轴突反射和节段反射途径作用于脊髓相应节段中的植物神经中枢，调整内脏功能。此外，针刺的良性信息会作用于大脑皮质，激发高级神经中枢的整合、调整功能，产生一系列神经体液的调节机制，达到恢复生理平衡、消除病理过程，抵御疾病的目的[21]。

# 3 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠血清抗炎因子TNF-a、ICAM-1的影响

心肌缺血再灌注损伤本质上是一种强烈的炎性损伤的过程。炎症反应在心肌缺血阶段被激活，再灌注时则显著加剧了心肌的炎症反应。

TNF-α是一种具有广泛生物学效应的细胞因子。研究表明，TNF-α在心肌缺血再灌注损伤中发挥了重要作用[22]。TNF-α在心肌缺血再灌注损伤中的作用机制是多方面的。TNF-α具有直接细胞毒作用，可引起细胞溶解；其释放超氧化物而引起DNA裂解；还可改变细胞的糖代谢，使细胞内pH值降低，导致细胞死亡。TNF-α作用于血管内皮细胞，促进血管内凝血，激活PMN黏附活性，增加心肌梗死面积。TNF-α还能诱导心肌细胞凋亡坏死，参与心肌损伤及重构。TNF-α能刺激血管内皮细胞和PMN表达内皮白细胞黏附分子(ELAM-1)和ICAM-1促进PMN聚集，导致PMN释放活性氧及蛋白水解酶等物质，引起心肌损伤和心肌微血管的阻塞，加重缺血再灌注损伤程度[23～24]。心肌巨噬细胞和心肌细胞本身都可以合成TNF-α，在心肌缺血再灌注过程中心肌细胞分泌的TNF-α与单核巨噬细胞所合成分泌的TNF-α量大体相当[25]。这些大量出现的炎性TNF-α造成了心肌缺血再灌注的损伤。

ICAM-1是介导中性粒细胞黏附浸润的最重要因素之一[26]。ICAM-1作为白细胞功能相关抗原(LFA-1)、巨噬细胞分化抗原-1(MAC-1)的配体，其参与了白细胞与血管内皮细胞的黏附并向血管外迁移，缺血再灌注损伤中引发了黏附心肌细胞，释放细胞毒的病理反应。这种由于缺血再灌注引起的高表达的ICAM-1的可刺激多形核白细胞

（PMNs）与内皮细胞黏附，介导其对心肌细胞的浸润，引起并加剧心肌细胞的损伤，导致细胞死亡[27]。

本实验发现心脏冠状动脉结扎20min再灌注后TNF-α和ICAM-1含量明显增加(P<0.05)，提示炎性细胞因子TNF-α、ICAM-1可能参与了心肌缺血再灌注的损伤过程，加重了心肌组织的灌注障碍。电针心俞、厥阴俞后可以降低心肌细胞TNF-α、ICAM-1

的生成，从而减轻由它们引起的心肌炎性反应。其中，电针心俞、厥阴俞对针刺3天后大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量的影响不大，未能有效低于模型组，而针刺

7天之后，大鼠血清中TNF-α、ICAM-1的含量明显低于模型组，可见运用针刺的方法治疗心肌缺血再灌注损伤，从抗炎角度分析，需要至少7天的治疗时间。从大鼠血清中TNF-α、ICAM-1含量的变化趋势来看，针刺对ICAM-1含量的影响可能是一个持续缓慢的过程，而对TNF-α含量的影响可能是级进式的。

# 4 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响

心肌细胞凋亡是引起心肌缺血再灌注损伤的重要原因，若能减轻再灌后心肌细胞的凋亡，将是治疗心肌缺血再灌注损伤的有效途径。细胞凋亡是一个非常复杂的过程，可受到机体内外多种因素的影响。细胞凋亡又称程序性细胞死亡，是指有核细胞在一定条件下通过启动其内部机制，主要通过内源性DNA内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程，是受基因控制的一种主动性细胞死亡现象。当细胞受到来自细胞内外的凋亡诱导因素作用时就会启动，因此，凋亡诱导因素是凋亡程序的启动者。在心肌细胞凋亡中，心肌缺血再灌注是诱导因素，实验研究己经证实心肌缺血再灌注可以引起凋亡，且在心肌缺血再灌注所引起的细胞凋亡和坏死中，凋亡占相当的比例[28-29]大鼠心肌梗死早期(6h内)损伤的主要形式是细胞凋亡，随后细胞死亡逐渐增加，成为梗死后细胞进行性丢失的主要原因。大鼠心肌缺血45分再灌注1小时便出现细胞凋亡。

狗心脏单纯缺血7个小时，仍未发生心肌细胞凋亡；缺血69分、再灌注6个小时，出现明显的心肌细胞凋亡[30]因此心肌缺血再灌注损伤的发生与细胞凋亡密切相关[31]。

本实验通过大鼠在体心肌缺血/再灌注模型，采用脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法（TUNEL）检测凋亡心肌细胞。TUNEL法是由Gavrieli[55]创立的，其检测心肌细胞凋亡的原理：在细胞凋亡过程中，基因组DNA会断裂产生双链，低分子量的

DNA片段和高分子的单链DNA断端，这些DNA链缺口可以利用酶标记核苷酸3/末端核苷酸聚合反应，从而标记DNA断端缺口。石蜡切片在末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）介导下，使生物素化的dUTP标记DNA断裂后形成的3/—ＯＨ末端，借助生物素与亲和素的特异结合，使过氧化物酶连接至ＤＮＡ断点，最后加入底物，通过DAB显色，在光镜下可观察到细胞核呈棕褐色的凋亡细胞。

TUNEL法的优点：它是分子生物学和形态学相结合的一种研究方法，对完整的单个凋亡细胞核和凋亡小体进行原位染色，能准确的反应细胞凋亡最典型的生物化学和

形态特征，而且其灵敏度很高，能检测出极少量的凋亡细胞。

本实验在缺血再灌注组大鼠心肌中，用TUNEL法检测到大量的阳性细胞。这说明在缺血再灌注中有凋亡心肌细胞伴随着心肌细胞的坏死，这种凋亡心肌细胞参与缺血再灌注损伤的发生、发展。除假手术组外，其他各组细胞凋亡指数远远大于假手术组，可见如果没有行冠脉结扎再灌术，即使开胸，在心肌上穿刺（假手术组只穿线，不结扎）也不会引起心肌细胞大量凋亡，而正常的心肌细胞中会存在少量细胞凋亡。而当某些抑制性因素作用于机体时，细胞凋亡的过程则会被抑制。针刺穴位，被认为是一种对机体的调整性刺激，从本实验可以看出，这种良性刺激，发挥了抑制心肌细胞凋亡的作用。

实验显示，造模后的各组，无论是否治疗，术后8天其细胞凋亡的表达高于术后

4天。由此得出，心肌缺血再灌注后心肌细胞的凋亡不是一瞬间发生的，可能是一个

持续的过程，这个过程至少持续8天，验证了临床上，急性心肌缺血的病人再灌注后，却逐渐出现心功能受损的表现，这一过程中如果不能进行持续的治疗，心肌细胞的凋亡将会不断出现，对心脏功能产生严重损害。

电针心俞、厥阴俞，心肌细胞凋亡指数虽然针刺7天（8.746±1.545）高于针刺

# 3 天（6.046±1.348），亦呈现出心肌细胞持续凋亡的趋势，但各自都低于模型组，显然电针背俞可以抑制心肌细胞的凋亡，而且这种治疗持续有效，提示我们临床治疗时应长期针刺，而不能仅仅针刺1天就结束治疗。

# 5 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡调控因素的影响

细胞凋亡的调控因素和机制非常复杂，多种基因、细胞因子及细胞内小分子都参与了对其调控作用，有的因素对细胞凋亡的发生起到了促进作用，而有的因素有抑制了细胞凋亡的发生，进而对机体产生保护作用。

## 5.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞Fas、FasL的影响

Fas又称Apo-1，现命名为CD95分子，是一种I细胞跨膜糖蛋白，属于肿瘤坏死因子受体( TNFR)及神经生长因子受体( NGFR)家族成员。人的Fas分子 由

325个氨基酸组成，由胞外区、跨膜区及胞质区组成。胞外区是结合Fas配体的特定部位，Fas抗原N末端49个氨基酸是特异性Fas配体与Fas抗原结合并诱导细胞凋亡的部位。由于Fas具有诱导凋亡的能力，并通过死亡域间作用促进Fas聚合传导死亡信号，Fas又称为死亡分子。Fas蛋白有两种形式： 膜

结合型( mFas)和可溶型( sFas)，主要以膜受体形式存在，mFas与相应抗体或其天然配体FasL结合，能诱发快速的细胞凋亡。

FasL是Fas抗原的天然配体，属于肿瘤坏死因子( TNF)家族的E型跨膜蛋白。FasL位于人和老鼠染色体lq23上，FasL主要表达于激活的T淋巴细胞和NK细胞，可诱导表达Fas的目标细胞凋亡。

Fas / FasL系统的主要功能是诱导细胞凋亡。Fas与FasL结合后引起Fas死亡域交联，通过细胞内的死亡功能区发挥作用，启动死亡信号传导，导致细胞凋亡。研究表明[32-34]，Fas和FasL表达的增加可促进细胞凋亡，而抑制Fas的表达可减少细胞凋亡。也有研究指出，FasL通过阻止细胞增生和细胞活素的释放而具有抗炎作用，从而发挥其在心肌缺血再灌注损伤中对心肌的保护作用。

在本研究中，通过假手术组和模型组的比较，可以得出，心肌缺血再灌注后Fas和FasL表达的增加，由此促进了细胞凋亡的发生，电针心俞、厥阴俞后，无论针刺

3天还是针刺7天，Fas和FasL表达均低于模型组，可见电针心俞、厥阴俞可以抑制Fas和FasL的表达，减轻Fas / FasL对心肌细胞凋亡的诱导作用。

通过不同时间段的比较，能够看出，模型组的Fas和FasL表达的增加，那么心肌缺血再灌注后数天，Fas和FasL依然增长，那么由此带动的细胞凋亡和心肌的损害仍然存在，并有可能加重。随着电针心俞、厥阴俞次数的增加，Fas的含量呈现降低趋势，但FasL的含量依然升高，可见电针心俞、厥阴俞对Fas的抑制效果明显，从而对Fas / FasL的表达产生抑制作用，而FasL表达的增加，可能是通过其抗炎作用，起到对心肌细胞的保护作用。这与针刺具有良性调整的作用相吻合。

## 5.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞P38MAPK的影响

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK），是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者，MAPK是将细胞外刺激信号转导到细胞内并引起细胞核内反应、最终影响基因转录和调控的通路，也是真核细胞转导细胞胞外信号到细胞内引起细胞反应的4大信号系统之一[35]。P38丝裂原活化蛋白激酶

（P38MAPK）蛋白是丝裂原活化蛋白激酶信号转导系统中的重要组成部分，主要参与应激与炎症反应。有研究认为P38MAPK激活后，可以导致多种器官的细胞凋亡[36-37]，但其对心肌缺血再灌注损伤存在双重调节机制：其一,在心肌缺血再灌注损伤发生时，

P38MAPK可通过介导Caspase-1、-3和-11的激活及参与Fas/Fas-L信号传导途径等

方式来促使心肌细胞凋亡，另一个方面，在心肌缺血再灌注损伤发生时, P38MAPK的激活会导致胞内小热休克蛋白（α-B晶体蛋白）在59位丝氨酸发生磷酸化，抑制线粒体通透性转换孔开放，从而保护心脏免受心肌缺血再灌注损伤的损伤[38-40]。因此，p38

MAPK的活化到底是促进细胞凋亡还是抑制细胞凋亡，目前尚存在争议。

p53是肿瘤抑制基因，一般认为p53的活化可导致细胞周期抑制和细胞凋亡，p38

MAPK与p53在调控细胞凋亡中，具有重要的功能联系。p38被激活后Ser15位点磷酸化p53，导致p53在细胞质中积聚，从而阻止了p53转位入核，发挥对细胞凋亡的保护作用。

本实验中，术后假手术组的P38MAPK呈高表达状态，其他各组均低于假手术组，可能是由于细胞凋亡消耗了大量P38MAPK，治疗组的P38MAPK PLI高于模型组，可见在心肌缺血再灌注时，P38MAPK被大量消耗，而电针心俞、厥阴俞促进了P38MAPK的表达，使其发挥对心脏的保护作用。针刺7天后P38MAPK PLI高于针刺3天，可见随着针刺的次数，P38MAPK增加，进一步保护心脏。

## 5.3 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞HtrA2的影响

HtrA2为一种丝氨酸蛋白酶，在组织器官中被普遍表达[41]，通常位于线粒体膜间隙，其基因定位于人类染色体2p12[42]，是心肌缺血再灌注损伤致心肌细胞凋亡的关键性物质。当心肌缺血再灌注损伤时，心肌细胞的线粒体膜的完整性受到破坏, HtrA2和细胞色素C从线粒体膜间隙转移至细胞质中。进入细胞质中的HtrA2可与染色体连锁凋亡蛋白抑制因子(X-chromosome-linked inhibitor of apoptosisprotein, XIAP)结合并促使其降解，从而激活Caspase-9、-3和-7，促进细胞凋亡。心肌缺血再灌注诱导HtrA2从线粒体释放，这种易位可导致两种方式促进凋亡的发生：第一,结合XIAP通过caspases依赖的方式促凋亡[43]，XIAP可以与活性caspase-3,7,9的BIR结构域结合，并破坏它们的活性，在凋亡调节过程中发挥关键作用。第二,凭借其丝氨酸蛋白酶活性以多条途径促凋亡。HEGDE等[43]研究发现，仅具有蛋白酶活性而无与XIAP结合活性的HtrA2仍有促凋亡作用，而且该活性不能被caspase抑制剂所阻断，证明了其非

caspases依赖的促凋亡方式。无论Caspase-9-依赖性和Caspase-9-非依赖性心肌细胞凋亡的发生[44]，均提示抑制HtrA2的表达可有效阻止心肌缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡[45]。Liu等[46]研究了成年雄鼠心肌缺血再灌注损伤模型中Omi/HtrA2动态表达情况，并用Omi/HtrA2抑制剂做了更深一步研究，结果提示：Omi/HtrA2在第一时

间由线粒体释放入胞浆，在胞浆中通过其丝氨酸蛋白酶活性和caspases途径介导心肌凋亡的发生。

对心肌缺血再灌注损伤大鼠进行电针心俞、厥阴俞的治疗，抑制了HtrA2的释放表达，治疗组（39.83±3.41, 37.33±3.04）、阳性对照组（36.28±2.70, 38.40

±3.99）与模型组（49.73±4.67, 58.30±5.09）比较，HtrA2 PLI均低于模型组（P

＜0.05）。从而减轻了心肌缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡。

# 6 电针心俞、厥阴俞穴对心肌缺血再灌注大鼠5-LOX和CYP450的影响

## 6.1 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞5-LOX的影响

5-脂氧合酶(5-LOX)是一种单体蛋白，能催化花生四烯酸(AA)转化为5-氢过氧化二十碳四烯酸(5-HPETE)，进一步氧化为白三烯A4 (LTA4)，白三烯类代谢产物在炎性疾病、老年性痴呆和肿瘤等疾病中有着重要的作用。5-LOX是白三烯类代谢产物生成的关键酶，5-LOX的调节对多种疾病的发生发展有重要的意义[47]。

5-LOX可以通过分裂原活化蛋白激酶、细胞外信号调节激酶以及磷酯酰肌醇3激酶、蛋白激酶B等信号转导途径促进肿瘤细胞增殖，抑制肿瘤细胞凋亡，也有研究认为，当缺血再灌注发生时, 5-LOX可转移聚集至缺血再灌注器官，促使花生四烯酸转化为白三烯，后者引发炎症反应并加剧缺血器官的损伤，故5-LOX在心肌缺血再灌注发生后的炎症反应中起重要作用。

心肌缺血时大量Ca2+进入细胞内，介导一系列生化反应，其中Ca2+超载激活磷脂酶(phospholipase, PL)，激活后水解细胞膜磷脂，释放游离脂肪酸，尤其是PLA2催化生成大量AA，AA在心肌细胞中蓄积生成大量LTs的同时引发过氧化反应产生羟自由基(OHo)，心肌组织中各种不饱和脂肪酸易与OHo反应，生成一系列脂自由基使细胞膜遭到破坏。

体外分化HL-60细胞可以表达5-LOX，并表现出其酶活性。人血液中的转移生长因子β（TGF-β）阳可以上调分化的HL-60细胞中5-LOX的表达。粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM一CSF)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)可以放大TGF-β的上调作用，细胞中脂类如维生素D3可以协同TGF-β的上调作用，TGF-β与低浓度的维生素D3联合使用可以使分化的HL-60细胞中5-LOX的活性达到正常中性粒细胞的水平。

本实验中，心肌缺血再灌注术后模型组大鼠的5-LOX表达升高，5-LOX则参与了包括细胞凋亡、促炎症反应和脂质过氧化等过程，从而引发了心肌缺血再灌注损伤。

而电针心俞、厥阴俞可能通过降低血液中肿瘤坏死因子α(TNF-α)的含量，抑制5-LOX的表达。针刺4天后5-LOX表达已接近假手术组，针刺7天仍保持低表达量，说明针刺心俞、厥阴俞，可以降低缺血再灌注后5-LOX的含量，从而起到保护心肌免受由5-LOX所引起的炎症反应侵害及降低5-LOX所造成的细胞凋亡。

## 6.2 电针心俞、厥阴俞对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞CYP450的影响

细胞色素CYP450单氧化酶在参与氧化还原反应的过程中，可激活分子氧并产生自由基，氧自由基增多、钙超载和白细胞激活是公认的MIRI机制，故CYP450与MIRI的发生有密切关系。心肌缺血还可引起磷脂分解并产生花生四烯酸，后者可通过细胞色素P450代谢途径，代谢为4种EETs: 5, 6-、8, 9-、11, 12-和14, 15-EET[48]，

EETs是一种内皮衍生性超极化因子，具有促进内皮细胞增殖、激活心肌ATP敏感性钾通道、抑制钠通道调控L-型钙通道、抗血栓形成、以及调节MAPK等功能，其对心肌缺血再灌注损伤的作用很可能通过多种途径发挥作用，如Moffat等[49]发现5, 6-EET及11, 12-EET可使细胞内钙离子浓度持续升高引起钙超载，从而延迟离体豚鼠心脏缺血再灌注时心功能的恢复时间, Granville等[50]发现, P450抑制剂氯霉素可减少离体大鼠心脏缺血再灌注后的心脏梗死面积。在心肌缺血再灌注发生时，血液中EETs水平显著上调，提示CYP450/EETs系统对心肌缺血再灌注损伤有一定影响[51]。

治疗组细胞色素P450单氧化酶蛋白的表达低于模型组，说明电针心俞、厥阴俞可以降低细胞色素P450单氧化酶，发挥抗炎、抗氧化等作用从而减轻其对心肌的损伤。

本研究通过以上实验研究可以看出，结扎大鼠冠状动脉左前降支20min再灌注后，大鼠的心肌受到损害，这种损害导致了心肌细胞凋亡。电针心俞、厥阴俞后，对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用和心肌细胞凋亡的抑制作用同电针内关穴基本相同，而电针阳陵泉穴基本无效，此作用的发挥，是通过降低炎性因子的产生和对心肌细胞凋亡相关因子的调控产生的。

结语

本研究结果显示，通过结扎大鼠冠状动脉左前降支再灌注的方法可以成功建立

MIRI大鼠模型。在造成心肌损伤及心肌细胞凋亡后，进行针刺治疗，可以减轻心肌缺血再灌注引起的细胞凋亡和心肌损伤。电针心俞、厥阴俞穴治疗心肌缺血再灌注后的心肌损伤和心肌细胞凋亡，针刺7天的效果优于针刺3天。

从细胞-分子水平来看，电针心俞、厥阴俞穴治疗心肌缺血再灌注损伤可能是通过降低TNF-α、ICAM-1含量和抑制Fas、FasL、HtrA2、CYP450蛋白表达以及升高

P38MAPK蛋白表达来实现对缺血再灌注损伤中心肌细胞的保护作用，从而减轻了心肌细胞的凋亡。

电针心俞、厥阴俞穴对于大鼠心肌缺血再灌注的治疗作用与电针内关穴疗效相当。

本实验通过对经心肌缺血手术建立的MIRI模型大鼠进行长时间（8天）的饲养和电针心俞、厥阴俞治疗，并对不同治疗时间的疗效进行比较，评价其疗效差异，为临床应用提供参考。

由于实验条件和实验时间的限制，本实验样本量较小，实验手段尚不十分完善，仅能提供定性参考依据，若将来能进行较大样本量的研究，结果更有意义。

参考文献

[1]臧明霞，周杰.冠心病患者的心理特征分析[J].中国医药卫生，2005; 6(13)：97-98 .

[2] M. D. Menger, B. Vollmar. Pathomeehanisms of lschemia-Reperfusion lnjury as the Basis for Novel Preventive Strategies: Is It Time for the Introduetion of PleiotroPic ComPounds TransPlantation Proeeedings.2007; 39: 485-488.

[3] Kajstura J, ChengW, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996; 74: 86-107.

[4] Itoh G, Tamura J, Suiuki M, et al. DNA fragmention of human infared myocardial cells demonstrated bythe nick end labelingmethod and DNA agarose gel electrophoresis[J]. Am J Pathol, 1995; 146: 1325-1331.

[5] Bardoles RH, HailegLS, Xiess, et al. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infaction[J]. Am J Pathol, 1996; 149: 821-829.

[6] Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surving protion of the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 1996; 28(9)：2005-2016.

[7]赵明中，陈运贞.大鼠实验性心肌缺血再灌注时心肌细胞凋亡的动态变化及意义

[J]. 基础医学与临床，2000; 20(1)：52-55.

[8]常小娟；徐斌.针灸治疗心绞痛临床与实验用穴分析[J].现代中西医结合杂志，2009；18（6）：708-711.

[9]曹霞，卢秀花，崔新明等. 心肌缺血再灌注损伤中细胞凋亡及其信号转导通路的研究进展[J].吉林大学学报（医学版），2009; 35（5）：964-966.

[10]高俊虹，付卫星，晋志高等. 电针预治疗保护心肌缺血再灌注损伤——β-肾上腺素受体的耐受机制[J].针刺研究，2006; 01: 24-28.

[11]汪克明，王月兰，刘婧等.电针“内关”、“神门”预处理对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞尾加压素Ⅱ的影响[J].浙江中医药大学学报，2009; 01: 113-115.

[12]赵宇辉，孙忠人.针灸预处理对心肌缺血/再灌注大鼠细胞凋亡及相关基因表达的影响[J].心脏杂志，2009; 05: 63-65.

[13]赵宇辉.针灸预处理对心肌缺血大鼠预防性保护作用及机制研究[博士]。2008.

[14]丁章森. 厥阴俞透心俞穴埋线治疗冠心病的临床观察[J].针灸临床杂志，2002; 07: 45-46.

[15]韩友栋，张萍芝，管琳等. 心与心包俞募配穴法对冠心病患者心电图的影响[J]. 中国针灸，1994; 06: 5-6,57.

[16]展萍，张长河. 心俞穴在循环科疾病中的治疗作用[J].中国民康医学，2009; 24: 98, 110.

[17]刘宗军，江智文，温沁竹. 急性缺血诱导大鼠心肌细胞凋亡的时间演变和空间分布[J].中国病理生理杂志，2000; 16（11）：1221-1224.

[18] Chakrabarti S, Hoque AN, Karrnazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodiunm-hydrogen ex change inhibitor HOE 642(cariporide)[J]. J Moi ceii cardiol, 29(11)：3169-3174.

[19]邓爱华，曲宁，王言帅等. 细胞凋亡的调控机制[J]. 中国医学文摘・肿瘤学，2005；19（4）：326-328.

[20]刘立公，顾杰，沈雪勇.古代文献中心包经及其腧穴主治的统计报告上海针灸杂志，2005; 24(5)：29-30

[21]吴新贵，何源浩. 背俞穴的主治作用及其机制[J]. 中国临床康复，2006; 43(10)：170, 182.

[22] Yao YM, Yu Y, Wu Y, et al. The role of gut as a cytokine-generatingorgan in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion. Chin Med J, 1998; 111(6)：514.

[23] Patrick DA, Moore EE, Moore FA, et al. Lipid mediators upregulateCD11b and prime for concordant superoxide and elastase release in human

Neutrophils. J Trauma, 1997; 43: 297.

[24] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, et al. Anti-tumor necrosis factor alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. J AmColl Cardiol, 1997, 30: 1554.

[25] 6 Kapadia S, Lee J, Torre-Amione Getal. Tumor necrosis factora genean dprotein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. J Clin Invest, 1995; 96: 1042.

[26] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. Cire Res, 1996; 9: 949.

[27] Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional conse-quences of caspase activation in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99(9)：6252.

[28] Gottlieb RA, Engler RL. Apoptosis in myocardial i schemia- reperfusion. Ann N Y Acad Sci, 1999; 874: 412-26

[29] Anversa P, Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart: Circ Res, 1998; 82: 1231-1233

[30] Zhao ZQ, Nakamura M, Wang N, et al. Reperfusion induces myocardial anontotic cell death. Cardiovas Res, 2000; 45: 651-660.

[31] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et a1. Clinical implication of apoptosis in ischemic myocardium. Curr Porbl Cardio1, 2006; 31(3)：181-264.

[32] Kuhla A, Eipel C, Siebert N, et al．Hepatocellular apoptosis is mediated byTNFα-dependent Fas / FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liverfailure [J]．Apoptosis, 2008, 13( 12)：1427-1438．

[33] Mizuta M, Nakajima H, Mizuta N, et al．Fas ligand released by activated mon ocytes causes apoptosis of lung epithelial cells in human acute lung injury modelin vitro [J]．Biol Pharm Bull, 2008, 31( 3)：386-390．

[34] Imtiyaz HZ, Rosenberg S, Zhang Y, et al．The Fas-associated death domainprotein is required in apoptosis and TLR-induced proliferative

Responses in Bcells [J]．J Immunol, 2006, 176( 11)：6852-6861．

[35] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. Science, 2002; 298: 1911 -1912.

[36] KaiserRA, BuenoOF, LIPsDJ, et al. Targeted inhibition of P38 mitogen- aetivated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. The Joumal of biologieal ehemistry, 2004; 279: 15524-15530.

[37] Zarubin T, Han J. Aetivation and signaling of the P38MAP kinase pathway. Cell researeh, 2005; 15: 11-18.

[38] Shiraishi H, Toyozaki T, Tsukamoto Y, et al．Antibody binding to Fas ligandattenuates inflammatory cell infiltration and cytokine secretion, leading to reduction of myocardial infarct areas and reperfusion injury

[J]．Lab Invest, 2002, 82( 9)：1121-1129．

[39]陈冰心，任澎.心肌缺血再灌注损伤信号分子p38MAPK的研究进展[ J].心肺血管病杂志，2010; 29(1)：68-70

[40]叶云，祝晓光. p38MAPK与心肌缺血性损伤及其治疗[J].蚌埠医学院学报，2009, 34(4)：367-369

[41] Gray C W, Ward R V, Karran E, et al. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response[J]. Eur J Biochem, 2000; 267(18)：5 699-5 710.

[ 42] Verhagen A M, Silke J, Ekert P G, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins[J]. J Biol Chem, 2002; 277(1)：445-454.

[43] Hegde R, Srinivasula S M, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction [J]. J Biol Chem, 2002; 277: 432-438.

[44]刘慧荣，Ethe Gao，陶凌等. Omi/HtrAZ在小鼠心肌缺血/再灌注后细胞凋亡中

的作用[J].中国病理生理杂志，2004: 20（13）：2428-2429.

[45]吴烨，何玲.心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展及相关药物的研发[J].药学进展，2010; 34（7）：305-311.

[46] Liu H R, Gao E, Hu A, et al. Role of Omi/HtrA2 in apoptotic cell death after myocardial ischemia and reperfusion[J]. Circulation, 2005; 111(1)：90-96.

[47]李杰萍，梁统，周克元.5一脂氧合酶及其基因表达调控的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，2003; 24（4）：225-226,232.

[48] WangX L, Liang F, Jiao X Y, et al. Diverse effects ofLarginine on cardiac function of rats subjected tomyocardialischemia and reperfunsion invivo[J]. Acta Biochim BiophysSin, 2007; 39(3)：201-207

[49] MoffatM P, Ward CA, Bend JR, etal. Effects ofepoxyeicostrienoic acids on isolated hearts and ventricularmyocytes [ J ]. Am J Physiol, 1993; 264 ( 4Pt2 ): H1154-H1160.

[50] Granville D J, Tashakkor B, Takeuchi C, et al. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors[ J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004; 101(5)：1321-1326.

[51] MoffatM P, Ward CA, Bend JR, et al. Effects ofepoxyei-costrienoic acids on isolated hearts and ventricularmyo-cytes [ J ]. Am J Physiol, 1993; 264 ( 4Pt2 ): H1154-H1160.

# 综述

心肌缺血再灌注损伤的研究

心脏疾病是当今人类疾病谱中三大致死病之一，其中缺血性心脏病是威胁人们健康的主要疾病。近年来，随着动脉搭桥术、经皮腔内冠脉血管成形术、溶栓疗法、体外循环心脏外科手术和心肺脑复苏术等手段的推广应用，使缺血的心脏可以在短时间内重新获得血液灌注并恢复供氧。多数情况下，缺血后再灌注可使损伤的心肌得到修复，心功能恢复，病情好转；但有时心肌缺血再灌注后不仅不能使心功能恢复，反而会加重心脏功能障碍和结构损伤。这种在心肌缺血基础上恢复血流后组织损伤加重、甚至发生不可逆性损伤的现象称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemiareperfusion injury, MIRI)。

1心肌缺血再灌注损伤的病理Th理改变及表现

恢复血液灌注为治疗缺血性疾病的基本原则，在临床上出现心肌缺血也是采取各种措施尽早恢复心脏的灌流。但是，近年来在大量的临床和实验研究中发现了一系列反常现象，如1955年Sewell等发现，结扎狗的冠状动脉后，突然恢复血液灌流，动物立即发生心室纤维颤动并导致死亡；1966年，Jennings首先提出缺血再灌注损伤的概念（ischemic reperfusion injury）：当组织细胞低灌流缺血后获得血液再供应时，不但未使组织细胞缺血性损害减轻或恢复，反而加重了缺血性损伤。

1.1心肌缺血再灌注损伤的病理生理改变

1.1.1超微结构的改变

缺血再灌注损伤时，心肌超微结构变化较单纯缺血时加重，表现为细胞膜和细胞器膜完整性破坏，如线粒体肿胀、嵴断裂、溶解和空泡形成，基质致密颗粒增多，并伴有大量的钙沉积、基质中致密物增多、肌纤维出现破坏性断裂、收缩带等。这些因再灌注而导致的超微结构的改变，被认为是心肌缺血时由可逆性损伤向不可逆性损伤改变的病理标志。

1.1.2心肌细胞损伤

心肌缺血缺氧引起的细胞损伤主要表现为细胞膜、线粒体及溶酶体结构和功能的改变[1]。

1.1.2.1心肌细胞膜的变化：

缺氧引起细胞膜对离子的通透性增高，Na+内流使细胞内Na+浓度增加，并激活

Na+/K+泵将Na+泵出，这一过程消耗ATP, ATP消耗过多促使线粒体氧化磷酸化增强。在严重缺氧时，ATP生成减少，使Na+/K+泵不能充分转运，致使细胞内Na+蓄积、渗透压升高，细胞外水分进入胞内，发生细胞水肿。实验显示缺血15 min后再灌注20 min即可出现明显的水肿，再灌注前缺血的时间愈长，再灌注所致细胞肿胀也愈明显，表明细胞损伤严重。缺氧时细胞内K+外流使细胞内缺K+，细胞内缺钾将导致酶的合成代谢障碍，进一步影响ATP的合成和离子泵的功能[2-4]。而且，随着缺氧程度加重，细胞膜通透性增加，使得Ca2+内流增加，发生Ca2+超载。黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶，进而增加自由基的生成，加重细胞损伤[5-7]。

1.1.2.2线粒体的变化：

线粒体损伤是缺氧后损伤的启动者[8]。细胞内的氧约有80%～90%在线粒体内参加氧化磷酸化生成ATP。缺血缺氧条件下，线粒体酶活性下降，线粒体氧化磷酸化受阻，导致线粒体呼吸链复合物损伤，ATP合成障碍，膜通透性增加，以及线粒体DNA损伤等改变，诱发细胞发生损伤。缺氧还使神经介质生成和生物转化过程减弱，心肌缺血时糖酵解增加，乳酸堆积，pH值下降，H+从线粒体外流入线粒体导致线粒体膜电位缺失和线粒体基质肿胀。当线粒体部位氧分压降到临界点0.1 kPa（<1mmHg）时，线粒体呼吸功能降低，ATP生成减少，严重时可出现肿胀、嵴崩解、外膜破碎和基质外溢等病变[9]。线粒体缺血缺氧性损伤是自身能量合成障碍所导致的一系列的病理性变化，主要是自由基与游离钙的增加，导致线粒体膜磷脂成分和结构的破坏，线粒体通透转换孔结构和成分的变化[10]。

1.1.2.3溶酶体的变化：

缺氧时酸中毒和胞质游离钙增加可引起磷脂酶活性增强，使溶酶体膜磷脂分解，膜通透性增大，溶酶体肿胀、破裂和大量溶酶体酶释出，进而导致细胞器周围组织的溶解和坏死[11]。

1.1.3微血管受损和无再灌注现象

心肌缺血再灌注后不但使心肌细胞发生上述的病理变化，同时也导致白细胞激活并与血管内皮细胞相互作用，发生固定黏附。由于白细胞浸润、氧自由基的产生、补体系统的激活而导致微血管的内皮水肿和破坏，致使扩血管的内皮扩张因子（EDRF）减少和收缩血管的内皮素等形成增多，以及血小板与白细胞粘附阻塞管壁，导致微血

管机械阻塞。结果由于微血管的收缩和阻塞，加之心肌缺血性的强烈收缩外在压挤心肌血管。结果，虽然恢复了器官的血液灌流，但灌流区组织却出现无再灌注现象

（no-reflow phenomenon）。在非梗死区相关血管也存在功能失调，提示心肌缺血可以通过释放细胞素刺激心肌细胞发生炎性反应，这种再灌注的微血管功能失调可能是由多种因素相互作用的结果。

1.2心肌缺血再灌注损伤的表现

1.2.1再灌注性心律失常（reperfusion arrhythemia）

在心肌缺血再灌注过程中出现的心律失常称为再灌注性心律失常（reperfusion

arrhythemia），常发生在再灌的初期，动物多在再灌10-20分钟发生，冠状动脉阻塞用链激酶治疗再通后的心律失常的发生率可达80%。其中以室性心律失常最为多见，主要表现为期前收缩、自发性室性节律或室性过速，多为一过性，但有时也可出现致死性室颤。一般认为临床上休克时心肌再灌或解除冠脉阻塞再灌后出现再灌注性心律失常，尤其致命性心律失常的机遇不大，因为再灌是逐步缓慢进行的。心律失常发生还与发生缺血心肌的数量、缺血的程度、再灌注时的血流速度、温度及电解质等因素有关。

1.2.2心室舒缩功能障碍

心肌缺血再灌注后虽然恢复了血压和血容量，但心脏的功能并未随之改善甚至恶化。主要是发生了再灌性心肌顿抑（myocardial stunning），所谓心肌顿抑是指心肌缺血恢复血液灌注后，而心肌的力学功能并未恢复，须经一定时间，有时须数天甚至数周后才能恢复，它是一种可逆性的心肌力学功能性障碍。常发生心肌缺血5 ~ 15

分钟再灌后（有时发生在缺血40-120分钟再灌注）的心肌坏死边缘区的心肌。再灌注时出现心室功能低下的另一个可能原因是再灌注损伤所致的心肌细胞的再灌性死亡。因细胞死亡发生的心室功能低下，则更难恢复

1.2.3心肌酶及钙蛋白亚单位漏出

由于再灌注损伤和胞膜通透性增高，使心肌富含有的酶如磷酸肌酸激酶（CPK）、乳酸脱氢酶（LDH）等大量漏出入血，致使血清中浓度升高。从血清这些酶活性升高的程度，即可反映心肌损害的程度。再灌注诱导上述酶的泄漏，虽与缺血损伤程度呈正相关，但对评定再灌注心肌死亡的意义敏感性不高，因为活心肌可含有失活酶，而死心肌细胞也可滞留活性酶。现认为钙蛋白亚基（Tn-T）为心肌具有高度特异性的小

分子量蛋白，心肌受损时更易漏出进入血液循环，故在血液中升高较CPK-MB还早，在血液中维持的时间也长。正常人血中的Tn-T浓度甚低，心肌细胞损伤时可超过正常水平上限的400余倍。由于Tn-T具有高度的特异性和敏感性，现认为它是反映心肌受损（包括再灌注损伤）的敏感指标。

2心肌缺血再灌注损伤的机制探讨

心肌缺血再灌注损伤的发生机制相当复杂，已有大量研究显示，心肌缺血再灌注损伤与Ca2+超载、能量代谢改变和细胞凋亡等过程密切相关[11-13]。目前普遍认可的可能机制中，有氧自由基损伤学说、细胞内Ca2+超载学说、炎性因子学说、酸中毒学说以及与L-精氨酸、5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、高温需求蛋白A2(high temperature requirementA2, HtrA2)、线粒体内膜通透性转换孔(mitochondrialpermeability transitionpore, MPTP)、细胞色素P450单氧化酶/环氧-二十碳三烯酸(EET)系统及P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)等内源性因素参与的细胞信号传导途径密切相关学说。

2.1氧自由基与心肌缺血再灌注损伤

氧自由基包括超氧阴离子（O2-）和羟自由基（-OH），如把单线态氧（O2）和过氧化氢（H2 O2）包括在内时，统称为活性氧（ROS）。正常细胞内有自由基清除剂如超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和维生素等，可清除氧自由基，故体内自由基的生成与清除保持动态平衡。自由基有一定灭菌防卫的作用，因此少量自由基是人体生命所必需，不造成组织损伤。然而当组织细胞缺血缺氧时，氧自由基清除系统功能降低，生成系统活性增强，一旦恢复组织血液供应和氧供，氧自由基便大量产生。自由基一旦生成，可经其中间代谢产物不断扩展生成新的自由基，形成连锁反应，并急剧“堆积”。由由基可与各种细胞成分，如膜磷脂、蛋白质、核酸等发生反应，损伤组织细胞，造成细胞结构损伤和功能代谢障碍[14, 15]。自由基的损伤作用表现为膜脂质过氧化增强、破坏蛋白质和酶、破坏核酸及染色体和破坏细胞间基质。

2.2钙离子超载与心肌缺血再灌注损伤

在缺血再灌注损伤时，维持细胞内外钙稳态的机制被破坏，大量钙离子进入细胞内，使细胞内钙浓度明显增加，对细胞产生一系列严重损害，细胞内钙浓度往往与细胞受损程度呈正相关。各种原因引起的细胞内钙含量异常增多并导致细胞结构损伤和

功能代谢障碍的现象称为钙超载(calcium overload)，严重者可造成细胞死亡。目前认为，细胞内钙离子超载是细胞损伤不可逆发展的共同通路[16-17]。随着研究的深入，线粒体内钙离子浓度升高在心肌缺血损伤中的重要作用逐渐被认识。

2.3炎性因子与心肌缺血再灌注损伤

心肌缺血再灌注损伤后除了心肌缺血性损伤外，免疫介导的炎症反应也起到加重心肌损伤和扩大心肌梗死范围的作用。坏死的心肌组织引起补体系统激活、细胞因子释放、炎细胞和免疫细胞趋化和浸润，同时亦通过病理性自身免疫应答参与心肌损伤。缺血再灌时，白细胞被激活，这些白细胞经趋化因子诱导游走随灌注血流进入缺血心肌，激活的中性粒细胞与血管内皮细胞发生固定粘附，形成微血栓，堵塞毛细血管，导致微血管机械阻塞，造成再灌注过程中局部的“无复流现象”[18]，加重心肌缺血性损伤，扩大心肌梗死面积，还可产生氧自由基诱导心肌细胞凋亡。激活的中性粒细胞可诱导CD11 /CD18在其细胞膜表达，释放出大量的炎性介质如TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、中性粒细胞活化蛋白（NAP1）、PAF、巨噬细胞炎症蛋白（MIP2）、补体C5a等进一步激活中性粒细胞[19]，不但可改变自身的结构和功能，而且使周围组织细胞受到损伤，导致局部炎症反应，致使心肌细胞发生不可逆性损伤。

2.4能量代谢障碍与心肌缺血再灌注损伤

心肌发生缺血时，心肌细胞迅速开始无氧代谢，提供能量减少，同时产生乳酸、游离的脂肪酸、肉毒碱COA等大量的有害代谢产物。心肌缺血时，随着ATP含量的下降，细胞膜、肌浆网Ca2+-ATP酶活力及肌浆网钙摄取能力下降，使钙内流增加，并激活膜磷脂酶，使膜磷脂降解为溶血磷脂，导致缺血性肌痉挛，并产生氧自由基，进一步产生损害作用[20]。有学者指出，能量代谢障碍可造成心肌细胞基因结构及表达的异常[21]，细胞内的ATP水平是决定细胞发生凋亡或坏死的主要因素。

2.5心肌缺血再灌注损伤分子机制的信号传导途径

2.5.1 5-脂氧合酶可能加重缺血再灌注后的炎症反应

当心肌缺血再灌注发生时，5-脂氧合酶（5-LOX）可以转移、聚集至缺血再灌注心肌细胞，并促使花生四烯酸转化为白三烯，而后者可引发炎症反应并加剧心肌的缺血损伤，因此很多人认为5-LOX在心肌缺血再灌注发生后的炎症反应中起重要作用。

2.5.2与L-精氨酸有关的心功能损伤

心肌缺血再灌注损伤发生时用于合成NO的L-精氨酸会不足，这可能会是导致心

肌缺血再灌注损伤继续恶化的关键因素[22]。心肌缺血再灌注损伤发生后心肌细胞对L-精氨酸的摄取量和NO水平均下降，线粒体膜电位亦下降，而同时ROS水平则增加，氧自由基便大量产生，从而造成心肌损伤。

2.5.3线粒体内膜通透性转换孔开放导致的心肌细胞凋亡

MPTP是位于线粒体内的非选择性、高导电性复核孔道，主要由线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channe, l VDAC)、内膜的腺苷酸转移酶、基质和亲环蛋白D等组成。VDAC参与维持线粒体膜的通透性，且在细胞凋亡和死亡中也起着重要作用。近来研究表明，心肌缺血再灌注期间MPTP会开放[23]，而环孢素A(cyclosporinA, CsA)可阻止其开放[24]。

2.5.4因高温需求蛋白A2泄露造成的心肌细胞凋亡

HtrA2为一种丝氨酸蛋白酶，是心肌缺血再灌注损伤致心肌细胞凋亡的关键性物质。其通常位于线粒体膜间隙，当心肌缺血再灌注损伤发生时，心肌细胞的线粒体膜完整性受到破坏, HtrA2和细胞色素C随之从线粒体膜间隙转移至细胞质中。流入细胞质中的细胞色素C会与脱氧腺苷三磷酸(dATP)、凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1 )及Caspase-9前体结合成为一个凋亡小体，从而激活Caspase-9和Caspase-3. X-染色体连锁凋亡蛋白抑制因子(X-chromosome-linked inhibitor of apoptosisprotein, XIAP)可抑制Caspase-9前体、Caspase-9、-3及-7的活性。而流入细胞质中的HtrA2可与XIAP结合并促使其降解，从而激活Caspase-9、-3和-7，促进细胞凋亡，提示抑制HtrA2的表达可有效阻止MIRI导致的心肌细胞凋亡[25]。

2.5.5与细胞色素P450单氧化酶相关的心功能损伤

CYP450在参与氧化还原反应的过程中往往可激活分子氧并产生自由基，故与心肌缺血再灌注损伤的发生有密切关系；心肌缺血可引起磷脂分解并产生花生四烯酸，后者可通过CYP450代谢途径代谢为4种EETs: 5, 6-、8, 9-、11, 11-和14, 15-EET[26]。

EETs是一种内皮衍生性超极化因子，具有促进内皮细胞增殖、抗血栓形成、激活心肌

ATP敏感性钾通道、调控L-型钙通道、抑制钠通道以及调节MAPK等功能。心肌缺血再灌注发生时血液中EETs水平显著上调，提示CYP450/EETs系统对心肌缺血再灌注损伤有一定影响。另外，也有人发现CYP450ω-羟化酶及其催化花生四烯酸产生的19-和20-羟烷四烯酸可加重心肌缺血再灌注损伤[27]。

2.5.6与P38丝裂原活化蛋白激酶途径相关的心功能损伤

MAPK信号转导系统可将细胞外信息传递到细胞内，以介导细胞产生各种反应，

P38MAPK蛋白是MAPK信号转导系统中的重要组成部分，其对心肌缺血再灌注损伤存在双重调节机制：一方面，在MIRI发生时, P38MAPK可通过介导Caspase-1、-3和-11的激活及参与Fas/Fas-L信号传导途径等方式来促使心肌细胞凋亡并加重心肌缺血再灌注损伤[28]；另一方面，在心肌缺血再灌注损伤发生时，P38MAPK的激活会导致胞内小热休克蛋白（α-B晶体蛋白）在59位丝氨酸发生磷酸化，抑制MPTP开放，从而保护心脏免受心肌缺血再灌注损伤[29]。

然而心肌缺血再灌注损伤发病机制相当复杂，且上述内源性物质中有许多均存在双重调节作用，且所涉及的信号途径在不同种类动物、同种动物的不同机体状态下可能完全不同。因此，对心肌缺血再灌注损伤机制的研究还在深入进行中。

3心肌缺血再灌注与细胞凋亡

3.1细胞凋亡概述

3.1.1细胞凋亡的概念

1885年Flemming曾发表细胞凋亡形态特征，他将其命名为染色质溶解

（chromatolysis）。1972年Kerr等首先用细胞凋亡(apoptosis)来描述一种与细胞坏死(necrosis)不同的、其过程被严密控制的细胞死亡机制。细胞凋亡（apoptosis）的概念是在体内外因素诱导下，由基因严格调控而发生的一种生理性细胞自杀过程，又称程序性细胞死亡（programmd cell death．PCD）。它是一个主动的、高度有序的、基因控制的，一系列酶参与的过程，是一个不同于细胞坏死的一种细胞死亡形式。

3.1.2细胞凋亡的形态学变化

细胞膜发生变化，微绒毛、细胞突起和细胞表面皱褶消失，胞膜迅速发生空泡化，内质网不断扩张并与胞膜融合，形成膜表面的芽状突起，称为出芽。胞质由于脱水而导致细胞皱缩、致密及固缩（condensation），是细胞凋亡形态学变化的一大特征。其中线粒体变大，嵴增多，线粒体增殖并空泡化。内质网腔扩大、增殖并在凋亡细胞形成自噬体过程中提供包裹膜。其他多数细胞器完整存在，变得致密。核内染色质浓缩，形成染色质块，并聚集在核膜的边缘，呈新月形、马蹄形或舟状分布，称为染色质边聚（margination）；或聚集在核中央，称为染色质中聚。随着染色质进一步聚集，核纤维层断裂消失，核膜在核膜孔处断裂，两断端向内包裹将聚集的染色质块分割，

形成若干个核碎片（核残块）。胞膜皱缩内陷，分割包裹胞质，内含DNA物质及细胞器，形成泡状小体称为凋亡小体，凋亡小体呈圆形、椭圆形或不规则状，小体内的成份主要是胞质、细胞器和核碎片。凋亡小体形成后，邻近细胞（巨噬细胞）识别其膜外的新的生物大分子磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine）并吞噬和消化。由于没有巨噬细胞吞噬凋亡小体，凋亡小体会发生肿胀、破裂、溶酶体释放等细胞坏死的表现，称为继发性坏死。

3.1.3细胞凋亡的生化改变

细胞凋亡期间尽管线粒体超微结构基本正常，但其功能已发生显著改变。凋亡刺激因素使线粒体内膜的跨膜电位降低，进而使线粒体通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放和线粒体膜通透性增高，导致线粒体内的细胞色素C(cytochrome c, Cyto-C)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、凋亡蛋白酶激活因子(apoptotic protease activating factor, Apaf)等凋亡启动因子释放入胞浆。

细胞凋亡过程中执行染色质DNA切割任务的是内源性核酸内切酶，内源性核酸内切酶作用于DNA双链，形成高分子量的DNA片段或180-200bp整倍数的片段，在琼脂糖凝胶电泳中呈“梯”状(ladder pattern)条带，是判断凋亡发生的客观指标之一。

3.2细胞凋亡的发生机制

细胞凋亡是一个非常复杂的过程，受到机体内、外多种因素的影响，其具体的分子机制尚不完全清楚。细胞凋亡相关因素分诱导性因素和抑制性因素两大类。

3.2.1诱导性因素

细胞凋亡是一个程序化的过程，这个程序虽已预设于活细胞之中，正常情况下它并不“随意”启动，只有当细胞受到来自细胞内外的凋亡诱导因素作用时才会启动。因此，凋亡诱导因素是凋亡程序的启动者。在少数情况下细胞凋亡可自发产生，但多数是在诱导因素的作用下发生，常见诱导因素有：激素和生长因子失衡；射线、高温、强酸、强碱、乙醇、抗癌药物等理化因素；免疫性因素；细菌、病毒等致病微生物及其毒素；缺血与缺氧，神经递质（如谷氨酸、多巴胺）等。

3.2.2抑制性因素

细胞因子IL－2、神经生长因子等具有抑制凋亡的作用，而某些激素ACTH、睾丸酮、雌激素等对于防止靶细胞凋亡，维持其正常存活是必需的。某些二价金属阳离

子如Zn2+，药物如苯巴比妥，病毒如EB病毒，以及中性氨基酸等也具有抑制细胞凋亡的作用。

3.3细胞凋亡的信号转导通路

大多数情况下来自于细胞外的细胞凋亡诱导因素作用于细胞后要转化为细胞凋亡信号，并通过胞内不同的信号转导通路，最终激活细胞死亡程序，导致细胞凋亡。

3.3.1死亡受体通路

一些多肽通过激活受体（如Fas, TNFR1, DR3/Wsl-1）而直接诱导细胞凋亡。这些多肽属于肿瘤坏死因子（TNF）家族，它们与相应的肿瘤坏死因子受体（TNFR）家族成员结合，在许多的细胞类型中诱导凋亡。其激活途径为：配体与受体结合后，导致受体的三聚体化（trimerization）。使得受体的胞浆部分与接头蛋白（adapter protein）Fas-相关死亡蛋白(fas-associated protein with death domain, FADD)及procaspase-8结合，procaspase-8本身具有成熟的caspase-8酶的1-2%的活性，聚集后的procaspase-8通过自身或相互之间的切割产生成熟的caspase-8. caspase-8可激活下游的caspases-3，后者水解ICAD而活化CAD，从而导致细胞凋亡。caspase-8同时也激活Bcl-2家族的促凋亡因子Bid(binding interface

database）。正常状态下，Bid以非活性方式存在于胞浆内，当被caspase-8激活后，形成一种截短的Bid（truncated Bid, tBid），后者转移到线粒体，破坏线粒体膜的稳定性，导致细胞色素C等释放入胞浆，激活caspase-9,进一步强化了caspases级联反应。

3.3.2线粒体信号转导通路

一些凋亡刺激因素可使线粒体膜的通透性转换孔（permeability transition pore, PTP）打开或发生其它变化，进而促使线粒体释放凋亡启动因子(Cyto-C、AIF、Apaf-1)、Smac/Diablo(second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI)、HtrA2(high-temperature requirement factor A2)和procaspase-3入胞浆。上述因子通过下述多种机制导致细胞凋亡：①Cyto-C在dATP存在的情况下，与Apaf-1结合，使Apaf-1暴露其上的CARD（caspase activation and recruitment domain）基序，并与procaspase-9的CARD结合形成凋亡复合体（apoptosome）,导致procaspase-9激活，后者进一步激活caspase-3, 6等，从而诱导细胞凋亡。②AIF通过促进线粒体释放细胞色素C而增强凋亡信号，并

可快速激活核酸内切酶。③Smac/Diablo和HtrA2可能通过阻断凋亡抑制蛋白

（inhibitors of apoptosis protein, IAPs）的作用参与细胞凋亡的调控。IAPs为一组具有抑制凋亡作用的蛋白质，主要抑制caspase-3,7,9而抑制细胞凋亡。

3.3.3凋亡蛋白酶

凋亡蛋白酶的激活是凋亡发生机制中最关键的环节之一。凋亡蛋白酶（caspase, 是cysteine－containing aspartate-specific protease的缩写）是一组对底物的天冬氨酸部位有特异水解作用，其活性中心富含半胱氨酸的蛋白酶。依据caspases结构和功能的不同可分为三类：①起始凋亡蛋白酶（initiator caspases）,包括具有长N端前区的caspase-2,8,9,10，能对细胞凋亡的信号作出反应，启动细胞的自杀过程；②效应凋亡蛋白酶(effector caspases)：包括具有短N端前区的caspase-3, 6, 7，是细胞凋亡过程中的执行者，能水解特定蛋白底物。③与炎症有关的凋亡蛋白酶，包括caspase-1，4，5，11，12，13, 14。已确定的caspase作用底物有60多个，主要有：①凋亡蛋白酶激活的DNA酶抑制物（inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD）：caspases水解ICAD，使凋亡蛋白酶激活的DNA酶（caspases-activated deoxyribonuclease, CAD）处于活性状态并使DNA片段化。②核纤层(lamina)蛋白：被caspases分解后导致核裂解。③细胞骨架蛋白：caspases水解细胞的骨架蛋白，导致细胞解体，形成凋亡小体。④其它caspases：在凋亡级联反应（cascade）中，某些caspases可水解其它caspases。如：caspase-9可使caspase-3前体水解形成具有分解蛋白质活性的caspase-3。⑤灭活细胞凋亡的抑制物（如Bcl-2）,不仅消除了Bcl-2蛋白的抗细胞凋亡作用，而且Bcl-2水解片段也有促细胞凋亡的作用。总之，caspases在细胞凋亡的启动和完成中起重要作用，是细胞凋亡的执行者，决定了细胞凋亡的形态改变和生物化学改变。

3.3.4内源性核酸内切酶

细胞凋亡过程中执行染色质DNA切割任务的是内源性核酸内切酶，有Ca2+／Mg2+非依赖性核酸内切酶和Ca2+／Mg2+依赖性核酸内切酶。后者以无活性的形式存在于细胞核内，其激活需Ca2+／Mg2+等二价金属离子的存在。凋亡蛋白酶激活的DNA酶（CAD）就是一种细胞内源性核酸内切酶。正常情况下，CAD与ICAD结合成无活性的二聚体，位于胞浆中，当ICAD被caspase水解后，CAD与ICAD分离而被激活，从而进入细胞核，导致DNA的降解。

3.4细胞凋亡与心肌缺血再灌注

细胞凋亡在机体的一生中，从受精至成熟、老化等各个方面都发挥重要作用，而细胞凋亡调控异常可导致多种疾病的发生。心肌细胞虽为终末分化细胞，但仍存在凋亡，在心肌梗死、I/R损伤及慢性心衰等心脏疾病的动物模型及临床病人均观察到细胞凋亡的存在。

参考文献

[1] 金惠铭主编. 病理生理学（第六版）, 北京: 人民卫生出版社, 2005, 86-87.

[2] De Windt LJ, Willems J, Roemen TH, et al. Ischemic-reperfused isolated work ing mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A2[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280(6): H2571-80.

[3] Weiss JN, Vencatesh N. Lamp ST ATP sensitive K+ channels and cellular K+lost in hypoxia and ischemia mammalinan ventricle[J]. J Physiol(Lond), 1992; 447: 649.

[4] Wilde AA, Janse MJ. Electroph ysiological effects of ATP-sensitive potassium channel modulation: implications for arrhythmogenesis[J]. CardiovascRes, 1994; 28(1): 16.

[5] Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediatedcell injury and cell de ath[J]. FASEB J. 1995; 9(2): 219-28.

[6] Ju YK, Saint DA, Gage PW. Hypoxia increase persistent sodium current rat ventricular myocytes[J]. J Physiol (Lond), 1996, 497(pt2): 337.

[7] Trump BF, Berezesky IK. The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death [correcgted] [J]. New Hori z. 1996; 4(1): 139-50. 4(2): 146.

[8] Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO[J]. J Am Coll Cardiol. 2004; 43(5): 865-74.

[9] Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, et al. Mitochondrial

Dysfunction during hypoxia/reoxygenation and it s correction by anaerobic me tabolism of citric acid cycle intermediates[J]. Proc Natl Ac ad Sci U S A. 2000; 97(6): 2826-2831.

[10] 卢建菊, 陆惠玲. 线粒体DNA突变与心肌病关系的研究进展[J]. 法医学杂志2001; 17（4）: 243-246.

[11] Piper HM, Siegmund B, Ladilov YuV, et al. Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes[J]. Basic Res Cardiol, 1993; 88(5): 471-482.

[12] 杜健, 王晨净, 景志敏. 心肌缺血再灌注损伤中钙超载和氧自由基作用机制研究[J]. 卫生职业教育; 2009; 27(11): 121-123.

[13] 马国强, 李跃荣. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡的机制及其防治研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2007; 30(1): 50-52.

[14] Gaududy, Garellery MA. Role of oxygen radicalsin cardial injury due to reoxygenation[J]. J Molcell cardiol, 1984; 16: 459.

[15] Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: frie nd and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury[J]. J Molcell cardiol, 1984; 16: 969-975.

[16] Chen S J, Braley M E, Lee T C. et al. X hwmixal hypoxia triggers apoptosis of neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated protease and protein kinases[J]. Mol Cell Biochem, 1998; 178(12): 141-149.

[17] Murphy JG, Marsh JD, Smith TW. The role of calcium in ischemic myocardial injury[J]. Circulation, 1987: 75(6 Pt 2): 15-24.

[18] Kim HS, Hwang KC, Park WK. Cardioprotection via modulation of calcium homeostasis by thiopental in hypoxia-reoxygenated neonatal rat cardiomyocytes[J]. Yonsei Med J, 2010; 51(2): 187-96.

[19] Yoshiki Sawa, Hajime Ichikawa, Koji Kagi saki, et al. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes pr omotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium[J]. Thorac. Cardiovasc. Surg, 1998; 116: 511-515.

[20] 谷天祥, 张显清, 谷春久, 等, 心肌缺血再灌注损伤亚细胞Ca2+反常与ATP酶泵功能抑制[J]. 中华心血管病杂志, 2001; 29（7）: 420-423.

[21] Nordlie MA, Wold LE, Sinkhovich BZ, et al. Molecular aspects of ischemic heart disease ischemia/reperfusion induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy[J]. Cardiovasc Phamacol Thr, 2006; 11(1): 17-31.

[22] VenardosKM, ZattaA J, Marsha HT, et al. ReducedL-arginine transport contributes to the pathogenesis ofmyocardial ischemia-reperfusion injury[ J]. J Cell Biochem, 2009; 108(1): 156-168.

[23] Xie J R, Yu L N. Cardioprotective effects of cyclosporineA in anin vivomodelofmyocardial ischemia and reperfusion[J]. Acta AnaesthesiolScand, 2007; 51(7): 909-913.

[24] Zhang L K, Tang C S. Cytochrome P450/epoxyeicosatrienoic acids system and myocardial ischemia-reperfusioninjury[J]. Acta AcadMed Sin, 2005; 27(4): 539-542.

[25] 吴烨, 何玲. 心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展及相关药物的研发[J] 药学进展, 2010; 34(7), 305-312

[26] WangX L, Liang F, Jiao X Y, et al. Diverse effects ofL-arginine on cardiac function of rats subjected tomyocardialischemia and reperfunsion invivo[J]. Acta Biochim BiophysSin, 2007; 39(3): 201-207.

[27] Lu X J, Wan J, Yang J, et al. Cytochrome P450ω-hydroxylase inhibition reduces cardiomyocyte apoptosis via activation of ERK1/2 signaling in rat myocardial ischemiareperfusion [ J]. Eur J Pharmacol, 2008; 596: 118-126.

[28] 叶云, 祝晓光. p38MAPK与心肌缺血性损伤及其治疗[J]. 蚌埠医学院学报, 2009; 34(4): 367-369.

[29] 陈冰心, 任澎. 心肌缺血再灌注损伤信号分子p38MAPK的研究进展[ J]. 心肺血管病杂志, 2010; 29(1): 68-70.

附录

缩略语表

英文缩写英文全称中文全称

AI Apoptosis index凋亡指数

CYP450 cytochrome P450 monooxygenase细胞色素P450单氧化

酶

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay酶联免疫分析法HtrA2 high temperature requirementA2线粒体丝氨酸蛋白酶ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1细胞间黏附分子-1 5-LOX 5-lipoxygenase 5-脂氧合酶

MIRI myocardial ischemiareperfusion injury心肌缺血再灌注损伤PLI positive level index阳性水平指数P38MAPK P38 mitogen-activated protein kinaseP38丝裂原活化蛋白激酶

TNF-αTumor Necrosis Factor肿瘤坏死因子-α

TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl

Transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

原位末端标记法

致谢

本课题是在恩师谭奇纹教授严格教诲和悉心指导下完成的。导师渊博的知识、精湛的医术、高尚的医德、豁达宽容的处世风范、敏捷的思维和求实创新的科研意识，使我受益匪浅，也必将照亮我今后的人生旅程。衷心感谢恩师对我的辛勤培养、谆谆教诲和无微不至的关怀！

三年来，我之所以能克服种种困难是因为在背后有许多关心、鼓励和帮助我的人。值此论文完成之际，谨以最诚挚的感谢献给所有在学习和生活中给予我指导、关怀和帮助的人们！

衷心感谢乔海法教授对我的关心和鼓励！

感谢ft东中医药大学实验中心的赵鲁鸣老师和ft东省中医院实验中心的肖宁老师对我的无私帮助！

感谢同门的师兄、师弟、师妹在诸多方面给予的支持和帮助，尤其要感谢徐昔飞同学陪伴我度过在实验室的日日夜夜！

感谢我的家人，是他们的支持和一路相伴，使我顺利完成学业！感谢所有关心和帮助过我的老师和朋友们！